Über den Anoxie-Zyklus bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber

JOACHIM GRUNST

München ~~1967~~
1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0033

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in München
Direktor: Professor Dr. Dr. Theodor Bücher

Über den Anoxie-Zyklus bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Joachim Grunst

aus
Stolp/Pommern

München 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher
Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke
Dekan: Prof. Dr. F. Holle
Tag der mündlichen Prüfung: 5. März 1968

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	7
2.	Methodik	10
2.1.	Hämoglobinfreie Leberperfusion	10
2.1.1.	Perfusionsapparatur	10
2.1.1.1.	Säulenoxygenator	10
2.1.1.2.	Scheibenoxygenator	11
2.1.2.	Perfusionslösung	12
2.1.3.	Operationstechnik	12
2.1.3.1.	Tiermaterial	12
2.1.3.2.	Operationsverlauf	12
2.2.	Sauerstoffmessung im Perfusionssystem	13
2.2.1.	Platinelektrode	13
2.2.2.	Atmungsgröße	14
2.3.	Oberflächen-Fluoreszenz	14
2.4.	Anionenaustauschchromatographie freier Nukleotide im säurelöslichen Gewebsextrakt	15
2.4.1.	Automatische Anionenaustauschchromatographie im Nano-Bereich, nach SCHNITGER.	15
2.4.1.1.	Übersicht über die Apparatur	16
2.4.1.2.	Kolbenpumpen	16
2.4.1.3.	Chromatographiesäule	18
2.4.1.4.	Durchlaufküvette	18
2.4.1.5.	Prismen-Monochromator	18
2.4.1.6.	Automatisierung	20
2.4.1.7.	Austauscherharz	20
2.4.1.8.	Adsorption der Extrakte	20
2.4.1.9.	Elutionsmodus	21
2.4.1.10.	Elutionsmittel	21
2.4.1.11.	Identifizierung	23
2.4.1.12.	Auswertung	24
2.4.2.	Gewebsextraktion	27

2.5.	Metabolitbestimmungen im Perfusat	29
2.5.1.	Enzymatische und kolorimetrische Methoden	29
2.5.2.	Extraktbereitung	29
2.5.3.	Zusammensetzung der einzelnen Teste	29
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Metabolitgehalt des Lebergewebes im Anoxie-Zyklus	32
3.1.1.	Durchführung der Experimente	32
3.1.2.	Pyridinnukleotide	32
3.1.3.	Energiereiche Phosphate	35
3.1.4.	Harnsäure	37
3.1.5.	Uridindiphosphat-Derivate	39
3.2.	Metabolitkonzentrationen im Perfusat	39
3.2.1.	Durchführung der Experimente	39
3.2.2.	Lactat und Pyruvat	41
3.2.3.	ß-Hydroxybutyrat und Acetoacetat	42
3.2.4.	Redoxsysteme	43
3.2.5.	Glykolyse	47
3.2.6.	Glykogenolyse	48
3.2.7.	Ketogenese	48
3.2.8.	Harnstoffsynthese und Proteinkatabolismus	50
3.2.9.	Sauerstoffverbrauch	50
3.2.10.	Kontrollperfusionen	52
4.	Diskussion	53
4.1.	Wasserstoffanstau	53
4.2.	Zusammenbruch der Energetik	56
4.3.	Anaerobe Glykolyse und Glykogenolyse	62
5.	Zusammenfassung	65
	Anhang	67
	Tabellen	67
	Verzeichnis der Abkürzungen	82
	Literatur	83

1. Einleitung

Untersuchungen der Koordination im Bereich des energieliefernden Stoffwechsels, die das zentrale Problem des Arbeitskreises um Prof. BÜCHER sind, erfordern 1.) ein geeignetes Untersuchungsobjekt, an dem 2.) mit geeigneten Maßnahmen in die Stoffwechselvorgänge eingegriffen werden kann.

Die Gesetzmäßigkeiten der einzelnen Systeme des energieliefernden Stoffwechsels sind vorwiegend an isolierten Zellfraktionen erarbeitet worden. Um ihr Zusammenwirken zu studieren, müssen sie in intakten Zellen vereinigt bleiben. Die einzelnen Zellen wiederum lassen sich nur dann weitgehend intakt erhalten, wenn sie in einem möglichst großen Parenchymverband vorliegen, in dem außerdem das physiologische Prinzip des An- und Abtransportes bestehen bleibt. Diese Bedingungen sind bei isoliert durchströmten Organen gegeben, die jedoch für übersichtliche Versuchsbedingungen in ihrer Komplexität eingeschränkt werden müssen. SCHOLZ und BÜCHER (68,66) haben für Untersuchungen des energieliefernden Stoffwechsels in der Leber 1963-1964 eine hämoglobinfreie Perfusionsmethode entwickelt, die die Forderungen nach Standardisierung, Homogenität und Reproduzierbarkeit ausreichend erfüllt. Durch Verwendung einer synthetischen Perfusionslösung ist einerseits der Erythrozytenstoffwechsel ausgeschaltet; andererseits ermöglicht die Abwesenheit des Hämoglobins den Einsatz optischer Methoden, mit denen verschiedene Parameter im intakten Gewebe kontinuierlich gemessen werden können.

Ein wichtiger Eingriff in den energieliefernden Stoffwechsel ist der Sauerstoffentzug. Die hierbei zu Tage tretenden Koordinationen wurden bereits von PASTEUR (57,50) gesehen. Nach seinen Untersuchungen an Hefen bezeichnen wir heute die Steuerung der Glykolyse oder Gärung durch den aeroben Stoffwechsel als PASTEUR-Effekt. Das koppelnde Prinzip ist nach neueren Untersuchungen aus dem Arbeitskreis um LYNEN (46) anorganisches Phosphat und der Phosphatakzeptor ADP. Gegenüber anderen Eingriffen, z.B. Applikation von Inhibitoren, hat Sauerstoffentzug den Vorteil, daß sein Angriffspunkt genau umschrieben ist und die Einwirkung sehr schnell einsetzt und vollständig aufgehoben werden

kann. Der hämoglobinfrei perfundierten Leber wird der Sauerstoff durch kurzzeitige Durchströmung mit argongesättigter Lösung entzogen. Diese Folge von aerober, anaerober und wieder aerober Perfusion wird als "Anoxie-Zyklus" bezeichnet (66). Mit Hilfe der Oberflächen-Fluorometrie in der von CHANCE (7) angegebenen Technik lassen sich Veränderungen im Gehalt reduzierter Pyridinnukleotide kontinuierlich verfolgen, ohne daß die Integrität des Gewebes verletzt wird. Sauerstofffreie Durchströmung der Leber ruft eine Steigerung der Fluoreszenzintensität hervor, die im Anoxie-Zyklus eine charakteristische Kinetik erkennen läßt (66). In Abbildung 1 sind die Fluoreszenzregistrierungen von 4 Anoxiezyklen übereinandergezeichnet, die von derselben Stelle der Leberoberfläche, jedoch zu verschiedenen Zeiten einer dreistündigen Perfusion, aufgenommen wurden. Der Parameter Oberflächen-Fluoreszenz zeigt, daß die durch Sauerstoffentzug ausgelösten Veränderungen im Lebergewebe vollständig reversibel und reproduzierbar sind.

Beim Übergang zur Anoxie können in der Fluoreszenzkinetik drei deutlich voneinander abgesetzte Phasen unterschieden werden: 1.) eine Latenzphase, 2.) ein rascher Anstieg, der nach 15-20 sec Anoxie einsetzt und 3.) ein langsamer Anstieg, in den die 2. Phase nach 30-40 sec Anoxie übergeht. Nach Sauerstoffzufuhr bildet sich der Fluoreszenzanstieg in zwei Phasen zurück: 1.) ein rascher Abfall auf ungefähr 20% in der ersten Minute, 2.) ein langsames Absinken auf den Ausgangswert, der nach 10 min erreicht ist.

Aufgabe dieser Arbeit ist, verschiedene Parameter des energieliefernden Stoffwechsels (Pyridinnukleotide, energiereiche Phosphate) im Gewebe während des Anoxie-Zyklus zu analysieren und der Fluoreszenzkinetik zuzuordnen. Diese Untersuchungen knüpfen an die Arbeiten von LÜBBERS et al. (45) an, bei denen mit Hilfe von Reflexions-Spektrophotometrie die spektralen Änderungen der Cytochrome registriert und ebenfalls zur Fluoreszenzkinetik in Beziehung gesetzt wurden.

Mit der Registrierung der Oberflächen-Fluoreszenz und den Analysen der reduzierten Pyridinnukleotide wird die Summe der freien und gebundenen Nukleotide in sämtlichen Räumen der Zelle

erfaßt. Diese Methoden geben keinen Aufschluß über die tatsächlichen Reaktionen in den einzelnen Redoxsystemen. Sie können jedoch mit Hilfe von Perfusatanalysen verfolgt werden. Die Substratpaare Lactat-Pyruvat und ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat tauschen sich schnell mit dem extracellulären Raum aus. Die Verhältnisse ihrer Konzentrationen im Perfusat können als Redox-Indikatoren für das Kompartiment angesehen werden, in dem die vermittelnden Enzyme lokalisiert sind. Mit dieser sogenannten indirekten Potentialmessung soll die Beteiligung extra- und intramitochondrialer Systeme an den Redoxveränderungen in der Anoxie untersucht werden.

Ein Maß für den Umsatz in den verschiedenen Stoffwechselwegen ist die Geschwindigkeit, mit der ihre Endprodukte in das Perfusat ausgeschüttet werden. Perfusatanalysen geben deshalb zusätzliche Informationen über die Umschaltung im Katabolismus beim Übergang zur Anaerobiose.

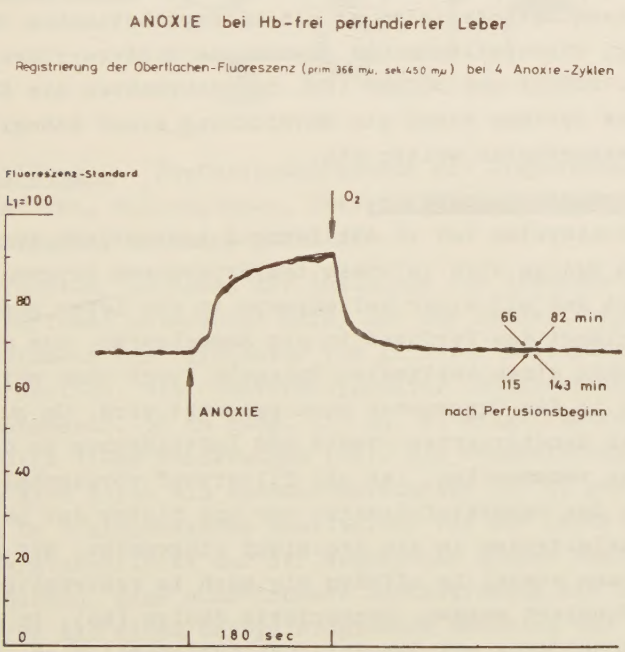

Abbildung 1 Fluoreszenzkurven von 4 Anoxie-Zyklen, registriert an einer Stelle zu verschiedenen Perfusionszeiten.(Expt. 27).(66).

2. Methodik

2.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion

Stoffwechseluntersuchungen an isolierten, durchströmten Organen haben einerseits den Vorteil, daß das Objekt den Einflüssen des Gesamtorganismus entzogen und damit die Komplexität eingeschränkt ist. Andererseits erlauben sie in stärkerem Maße Rückschlüsse auf physiologische Zustände, als dies bei Untersuchungen an aufgearbeitetem Gewebe (z.B. Gewebsschnitte, Homogenate, Zellfraktionen) möglich ist. Das Kreislaufprinzip und die morphologische Organisation entsprechen bei einem solchen Perfusionsexperiment den Verhältnissen in vivo. Perfusionen isolierter Rattenlebern wurden erstmals von COREY und BRITTON 1941 (15), TROWELL 1942 (74), später von BRAUER et al. 1951 (3) und MILLER et al. 1951 (51) durchgeführt. MILLER durchströmte mit heparinisiertem Rattenblut, SCHIMASSEK (59) modifizierte diese Methode indem er ein halbsynthetisches Medium (Salzlösung, Rinderalbumin und gewaschene Rindererythrozyten) verwendete. SCHOLZ und BÜCHER (68, 66) schränkten die Komplexität des Systems durch die Entwicklung einer hämoglobinfreien Leberperfusion weiter ein.

2.1.1. Perfusionsapparatur:

Das Perfusionssystem ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Das Medium wird in einem temperierbaren Oxygenator aufgesättigt und mit einer Rollenpumpe in die Leber gepumpt. Von dort gelangt das Perfusat in ein Sammelgefäß, aus dem es nach Erreichen eines bestimmten Spiegels durch eine weitere Rollenpumpe in den Oxygenator zurückgepumpt wird. Um zu verhindern, daß denaturiertes Eiweiß und Luftbläschen in der Leber Embolien verursachen, ist ein Filtertopf vorgeschaltet. Zur Messung des Sauerstoffdruckes vor und hinter der Leber sind Platinelektroden in den Kreislauf eingesetzt. Mit dieser Anordnung kann sowohl im offenen als auch im rezirkulierenden System perfundiert werden. Temperierte Säulen (66), in denen die Perfusionslösung mit Gasgemischen durchperlt wird, werden in Versuchen verwendet, in denen die Stoffwechselkinetik im Gewebe beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Status unter-

sucht wird. Ein Dreiwegehahn ermöglicht die Umschaltung der Perfusion von der einen auf die andere Säule, wodurch bei unveränderter Durchströmung der Leber verschiedene Zustände der Sauerstoffversorgung erreicht werden können (Wechsel von Normoxie auf Anoxie, bzw. von Anoxie auf Normoxie).

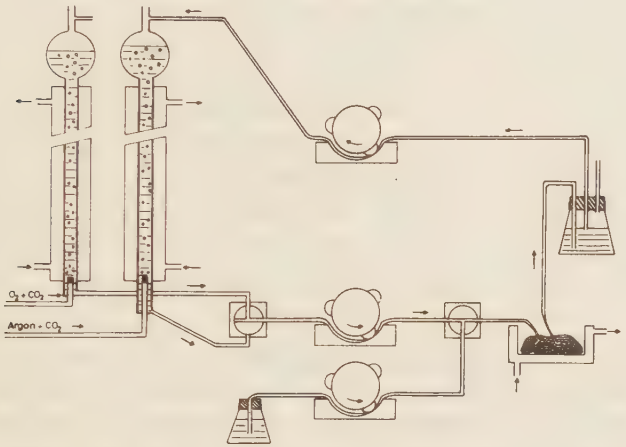

Abbildung 2 Perfusionsapparatur mit Dispersionsoxygenatoren, Rollenpumpen, Dreiwegehähnen, temperiertem Lebergefäß, Rückstau-Gefäß usw.

In Experimenten, in denen der Austausch der Gewebsmetabolite mit dem Perfusat untersucht wird, ist zur Reduzierung des Perfusionsvolumens ein Oxygenator von größerer Sättigungskapazität erforderlich. Ein Scheibenoxygenator (Polypropylenwalze, 8 cm Durchmesser, 30 cm lang, mit ca. 40 eingefrästen Scheiben) erfüllt diese Forderungen (78). Die Temperierung des Oxygenators wird durch ein Kontaktthermometer (37°C) gesteuert, das sich im Schlauchsystem unmittelbar vor der Leber befindet. Die Temperaturverluste auf der Wegstrecke können damit ausgeglichen werden. Eine ausreichende Durchströmung der Leberperipherie wird mit einem unphysiologischen Rückstau von 3-5 cm Wassersäule erreicht. Die Folge ist eine Schwellung der Leber um den Faktor 1,7-1,8 und eine Verstärkung des Lymphstromes,

die zu einem teilweisen Abfließen des Perfusats über die Oberfläche führt (zu Beginn der Perfusion ca. 20%, nach 3 Stunden ca. 40%).

2.1.2. Perfusionslösung:

Die Perfusionslösung besteht aus einer Elektrolytlösung (SCHIMASSEK (59)), 7 g% Dextran als onkotische Substanz (7 g% Rheomakrodex, mittleres Molekulargewicht 40000, Fa. Knoll AG., Ludwigshafen) und einem Aminosäuregemisch (61):

Elektrolyte	Aminosäuren (L)
137,0 mM NaCl	0,1 mM Asparaginsäure
2,7 mM KCl	0,2 mM Threonin
0,7 mM NaH_2PO_4	0,3 mM Serin
0,5 mM $CaCl_2$	0,6 mM Alanin
0,5 mM $MgCl_2$	0,5 mM Glykokoll
23,0 mM $NaHCO_3$	0,9 mM Glutaminsäure
	0,9 mM Glutamin

Die Perfusionslösung wird mit 95% O_2 und 5% CO_2, bzw. mit 95% Argon und 5% CO_2 aufgesättigt. Die Gasgemische werden wasserdampfgesättigt in den Oxygenator eingeleitet. Durch den Bicarbonat-Puffer (23 mM $NaHCO_3$, 5 Vol.% CO_2) ist der PH-Wert auf 7,4 eingestellt.

2.1.3. Operationstechnik

Als Versuchstiere dienten weibliche Wistar II Ratten von 200-250 g, aus der Tierzüchterei Brünger (Bokel), die mit "Altrumin" Standardnahrung gefüttert wurden. Die Tiere wurden narkotisiert durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (5 mg/100 g Lebendgewicht), das sich leicht aus der Leber auswaschen läßt (71). Bei Operationsbeginn wurde Heparin (Liquemin "Roche" 1000 I.E./100 g) als Antikoagulantium in die Vena saphena injiziert. Nach Eröffnung des Abdomens mit einem Medianschnitt wird der Magen freipräpariert, vom Oesophagus abgetrennt und zur Seite geklappt. Die Vena cava wird dicht oberhalb des Abganges der Nierenvenen umschlungen. Um die Vena portae werden 2 lockere Ligaturen gelegt, wobei der am weitesten leberwärts gelegene Zufluß erfaßt werden muß. Nach Incision der Pfortader wird eine Polyäthylenkanüle bei langsam laufender Perfusions-

pumpe (10-15 ml/Min.) eingeschoben und eingebunden. Innerhalb von 2-3 sec ist die Leber entblutet und zeigt ihre gelblich-braune Eigenfarbe. Nach Ligatur der Vena cava inf. wird der Thorax parasternal eröffnet. Durch das rechte Herzohr wird eine Kunststoffkanüle in die Vena cava bis zur Einmündung der Lebervenen vorgeschoben und zusammen mit einem Zwerchfellzipfel eingebunden. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird nun auf 25-30 ml pro Minute gesteigert. Nach Präparation aus dem Situs wird die Leber in das temperierte Gefäß gehängt. Die gesamte Operation dauert 7-8 Minuten. Davon entfallen auf die Zeit vom Einführen der Pfortaderkanüle bis zum Einbinden der Cavakanüle ca. 2 min. Nur während dieser Phase der Operation ist die Leber nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt (Hypoxie). Im Unterschied zu der Operationstechnik nach MILLER (51) und SCHIMASSEK (60) ist bei dieser Methode die Leberdurchströmung nicht unterbrochen und die Hypoxie erheblich verkürzt.

2.2. Sauerstoffmessung im Perfusionssystem

Der im Perfusionsmedium gelöste Sauerstoff wird amperometrisch mit der stabilisierten, spaltlosen Ganzglas-Platinelektrode nach LÜBBERS bestimmt (26), einer Modifizierung der von CLARK 1953 (13), 1956 (12) beschriebenen Meßanordnung.

Eine Platinkathode und eine Ag/AgCl-Anode, durch eine Elektrolytlösung verbunden, sind von der Meßlösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran getrennt. Bei Anlegen einer negativen Spannung wird an der Platinoberfläche Sauerstoff reduziert, wofür in neutraler und alkalischer Lösung folgende Gleichung vorgeschlagen wurde (41,73):

$$O_2 + 2\,H_2O + 2\,e^- \longrightarrow H_2O_2 + 2\,OH^-$$

$$H_2O_2 + 2\,e^- \longrightarrow 2\,OH^- + 2\,H^+ \longrightarrow 2\,H_2O$$

Je mehr Sauerstoffmoleküle reduziert werden, desto stärker ist der Reduktionsstrom bzw. Diffusionsstrom im Meßkreis. Bei einer bestimmten Spannung (Polarisationsspannung) ist die Stromstärke proportional dem nachdiffundierenden Sauerstoff . Die Elektroden (Durchmesser des Platindrahtes 0,5 mm) sind in Meßgefäßen aus Plexiglas vor und hinter der Leber in das Perfusionssystem ein-

geschaltet. Um an der Elektrodenoberfläche die gleichen Sauerstoffkonzentrationen wie im Perfusat zu erreichen, wird in diesen Meßgefäßen mit einem in Kunststoff gehüllten Magneten gerührt. Gemessen wurde bei 600 mV Betriebsspannung, die sich aus Polarogrammen dieser Elektroden ergab (71). Die Elektroden werden mit Perfusionslösung, die mit Luft und definierten Gasgemischen gesättigt ist, geeicht. Die Atmungsgröße des isolierten Organs ist bei konstanter Durchströmungsgeschwindigkeit proportional der Differenz der Sauerstoffdrucke vor und hinter der Leber. Sie läßt sich folgendermaßen berechnen:

$$\text{Atmung} = \frac{\text{AVD} \cdot a \cdot 2 \cdot D}{760 \cdot M \cdot FG} \quad /\mu\text{gAtom O}/ \text{ Std.} / \text{g (FG)}$$

AVD = p O_2(arteriell) - p O_2(venös) (torr)

a = BUNSEN'scher Absorptionskoeffizient = 0,023 ml O_2 gelöst in 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung bei 760 torr und 36°C;

D = Durchströmungsgeschwindigkeit (ml/Std)

FG = sog. Frischgewicht der Leber (g), d.i.: Trockengewicht x 5

M = Molvolumen = $22{,}4 \cdot 10^3$ml

2 .3. Oberflächenfluoreszenz

Die durch Licht von 366 nm angeregte Oberflächen-Fluoreszenz ist nach den Untersuchungen von CHANCE und Mitarbeitern (10) abhängig vom Gehalt reduzierter Pyridinnukleotide im Gewebe. Die kontinuierliche Messung der Fluoreszenzkinetik wurde entsprechend der von CHANCE angegebenen Methode durchgeführt. Es wird dazu ein Aufsichtsmikroskop (Ultrapak, Fa. Leitz, Wetzlar) verwendet, das mit einer wassergekühlten Quecksilberlampe (ST 40, Heräus, Hanau), Glasfiltern und einem Photomultiplier (RCA 1P 21) ausgerüstet ist. Die Primärstrahlung von 366 nm regt in der Leberoberfläche bis in eine Tiefe von 1-2 mm eine blaue Fluoreszenz mit einem Maximum von 450-480 nm an, die auf einen Photomultiplier geleitet wird. Das Prinzip des Fluorimeters ist im Blockdiagramm Abbildung 3 zu sehen. Stabilisierte Stromversorgung für Quecksilberlampe und Multiplier, sowie die Verstärkung erfolgt

über ein Photometerbauteil Eppendorf (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden auf einem Registriergerät (12-fach Punktedrucker, "Philips") kontinuierlich aufgezeichnet.

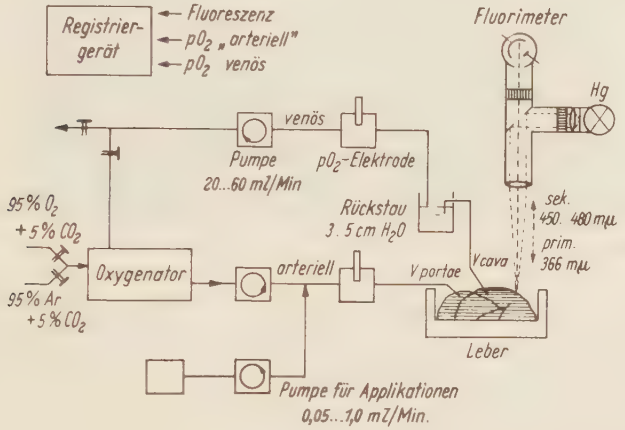

Abbildung 3 Blockdiagramm der Perfusionsapparatur mit Strahlengang des Fluorimeters (70).

2.4. Anionenaustauschchromatographie freier Nukleotide im säurelöslichen Gewebsextrakt.

2.4.1. Automatische Anionenaustauschchromatographie im Nano-Bereich, nach SCHNITGER (65).

Die Methode der Analyse von Phosphosäureestern mit Ionenaustauschchromatographie im biologischen Material geht auf COHN (14) zurück. Der Arbeitskreis um POTTER (33) hat diese Methode auf die Analyse freier Nukleotide in Gewebsextrakten angewendet. SCHNITGER beschrieb 1959 (64) eine modifizierte Anionenaustauschchromatographie, bei der durch Verringerung des Säulenquerschnitts, Verlängerung der Säulen und Reduzierung der Volumina eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber den bis-

her üblichen Verfahren um den Faktor 100 erzielt wurde.

Die Weiterentwicklung dieser Methode, die vor allem die Automatisierung, eine Steigerung der Empfindlichkeit um den Faktor 10 und die Verbesserung der Auftrennung betrifft, soll im folgenden beschrieben werden.

Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die Apparatur. Sie besteht aus einem Förderaggregat mit je 6 Misch- und Vorratsflaschen (rechts im Bild) und dem Meßteil, einem mit Monochromator und Küvettenwechselautomatik ausgerüsteten Photometer "Eppendorf" (links im Bild). Nicht abgebildet ist ein an das Photometer angeschlossenes Registriergerät.

Das Prinzip der von SCHNITGER entwickelten Anionenaustauschchromatographie ist in Abbildung 5 zu erkennen. Aus einer Vorratsflasche wird das Elutionsmittel (Ameisensäure plus Ammoniumformiat) in eine Mischflasche gedrückt. Beide Flaschen sind Kolbenpumpen (Abb. 6a,bzw. 6a'), bestehend aus dickwandigen Glasrohren (KPG-Rohre, Innendurchmesser 25 mm, Schott & Gen.) mit einem dicht sitzenden Kolben und einem Verschlußstück, beides aus Polypropylen. Der Kolben ist mit einem Dichtungsring aus Teflon in das Glasrohr eingepaßt. Bei relativ geringer Reibung kann diese Dichtung einem Überdruck von mehr als 6 Atmosphären ausgesetzt werden. Das Rohr wird im Förderaggregat fixiert. Die Kolbenstange berührt einen Vorschubbalken. Das Verschlußstück enthält einen Zuführ- und einen Abführschlauch und zusätzlich bei der Mischflasche (Abb. 6a') eine Mischvorrichtung. In einem Bohrkanal wird ein kunststoffumhüllter Magnetkern durch einen außerhalb der Pumpe rotierenden Magneten bewegt. Das in diesen Kanal hineingedrückte Elutionsmittel wird bei jedem Hub des Magnetkernes durch 2 Spritzdüsen in die Mischkammer hineingeschleudert, die zu Beginn ein bestimmtes Volumen entgastes, quarzdestilliertes Wasser enthält. Durch Variation des Kolbenvorschubes in beiden Flaschen lassen sich unterschiedliche Konzentrationsgradienten des Elutionsgemisches erzielen. Bei gleichem Vorschub entsteht ein linearer, bei unterschiedlichem Vorschub ein konvexer bzw. ein konkaver Gradient. Die Steilheit dieses Gradienten läßt sich durch Änderung sowohl des Mischkammervolumens als auch der Fördergeschwindigkeit variieren.

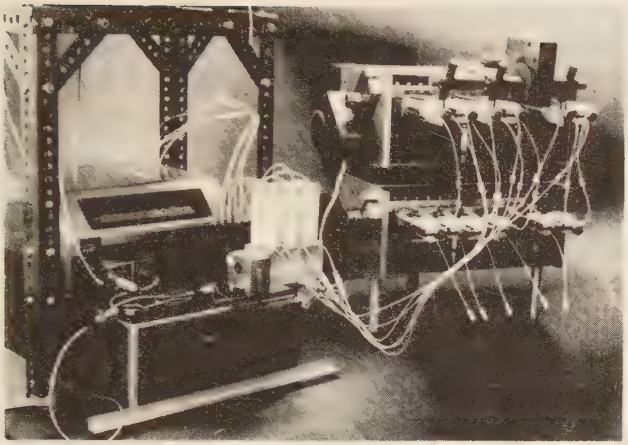

Abbildung 4 Apparatur für automatische Anionenaustauschchromatographie nach SCHNITGER (65). Förderaggregat mit je 6 Misch- und Vorratsflaschen (rechts im Bild); Meßteil, bestehend aus einem mit Monochromator und Küvettenwechselautomatik ausgerüstetem Photometer "Eppendorf" (links im Bild).

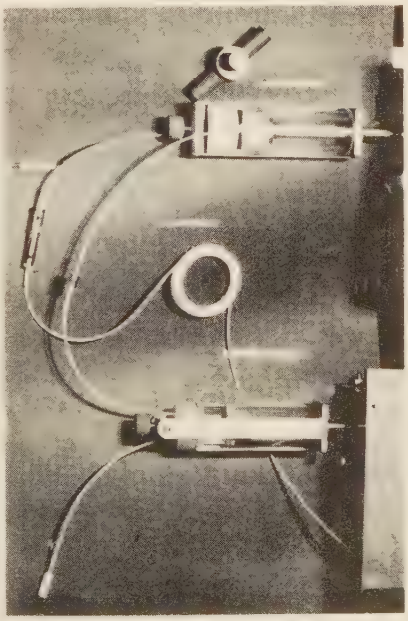

Abbildung 5 Prinzip der Anionenaustauschchromatographie. Das Elutionsmittel wird aus einer Vorratsflasche (unten im Bild) in eine Mischflasche (oben im Bild mit Rührmagneten abgebildet) gedrückt. Die Chromatographiesäule (mit feinkörnigem Austauscherharz gefüllt) ist in eine Vorsäule (5 cm langes Glasrohr, Innendurchmesser 2,00 mm) und in eine Hauptsäule (4 m langer Polyäthylenschlauch, Innendurchmesser 0,4 mm) getrennt. Die Hauptsäule ist direkt an eine Durchlaufküvette angeschlossen.

Die Chromatographiesäule ist mit einem feinkörnigen Austauscherharz von hohem Vernetzungsgrad ("Dowex" 1x8) gefüllt. Als entscheidende Neuerung ist sie in einen Speicherbereich (Vorsäule, Abb. 6b) und einen Trennbereich (Hauptsäule) unterteilt. Die Vorsäule besteht aus einem 5 cm langen Glasrohr (Innendurchmesser 2,00 mm), das gegen das Herausfallen von Austauscherkörnchen mit 2 "Dowex-Fallen" gesichert ist. An beiden Enden sind zur druckdichten Verbindung genormte Innenkonen eingeschliffen. Erst nach Adsorption des Extraktes wird diese Vorsäule an die Hauptsäule gekoppelt, die somit ausschließlich dem Trennungsvorgang dient. Die Hauptsäule besteht aus einem 4 m langen, dickwandigen Polyäthylenschlauch (Innendurchmesser 0,4 mm) mit an den Enden aufgepreßten Außenkonen. Sie ist auf einem temperierbaren Metallblock aufgewickelt. Unter Standardbedingungen wird bei 20°C eluiert. Höhere Temperaturen ermöglichen eine schnellere Durchströmung der Säulen und damit eine Verkürzung der Chromatographiedauer. Die Hauptsäule ist direkt an eine Durchlaufküvette angeschlossen. Dadurch werden unnötige Wegstrecken vermieden, so daß eine nachträgliche Verwischung des Trenneffektes, z.B. durch Diffusion, minimal ist.

Die Durchlaufküvette (Abb. 6c) enthält im Lichtweg (10 mm) eine Bohrung von 1 mm Durchmesser. Die Austauscherkörnchen werden oberhalb des Lichtweges durch eine "Dowex-Falle" zurückgehalten. Eine Blende von 0,2 mm Durchmesser, unmittelbar vor der Küvette angeordnet, sichert eine ausreichende Bündelung des Lichtstrahls. Das durch die Küvette fallende Licht trifft auf einen Photomultiplier (RCA 961). Die gemessenen Extinktionen werden im linearen Maßstab aufgezeichnet.

Ein Photometer "Eppendorf" ist zum Abtrennen einzelner Wellenlängen der Quecksilberdampflampe (Heräus ST 40) mit einem Prismen-Monochromator ausgerüstet, der alternierend einen Lichtstrahl von 265 und 280 nm durch die Küvette schickt. Der Wechsel der Wellenlängen wird durch das Registriergerät (12-Punktedrucker "Philips") gesteuert.

Große Schwierigkeiten bereitet das Problem, das System luftblasenfrei zu halten. Ausperlende Luftblasen in den Austauschersäulen verringern die Trennschärfe, in der Küvette verlegen sie den Lichtweg. Sämtliche Lösungen, d.i. Reinigungsflüssig-

keit, Dowexsuspension, Elutionsgemisch, werden deshalb sorgfältig entgast. Besonders gefährdet ist die Küvette. Um zu vermeiden, daß eine Entspannung bereits hier einsetzt, wird am Ende des Austrittsschlauches ein Überdruckventil (Bild 6d) eingeschaltet.

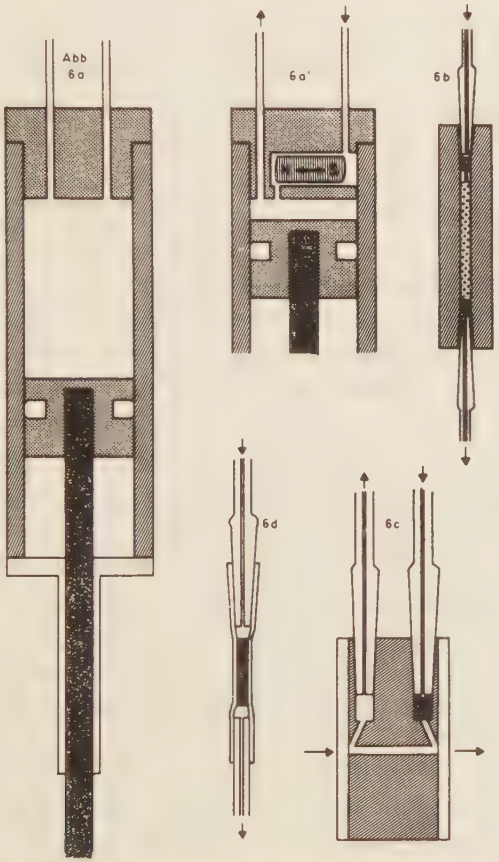

Abbildung 6 Kolbenpumpen der Anionenaustauschchromatographie. 6a: Vorratsflasche (KPG-Rohr, Innendurchmesser 25 mm, mit dichtsitzendem Kolben und Verschlußstück aus Polypropylen). 6a': Mischflasche mit Mischvorrichtung im Verschlußstück. 6b: Vorsäule (5 cm langes Glasrohr mit 2 "Dowex-Fallen" aus Gold und eingepreßten Anschlußkonen). 6c: Durchlaufküvette aus Quarzglas (Lichtweg: Bohrung mit Innendurchmesser von 1 mm). 6d: Überdruckventil (Silikonkautschukschlauch mit eingepaßtem zylindrischen Goldstück, Zu- und Abflußschlauch aus Polyäthylen).

Das ausfließende Eluat kann mit Hilfe eines früher beschriebenen Fraktionssammlers (64) in beliebig viele Einzelfraktionen aufgeteilt werden.

Ein besonderes Anliegen bei dieser methodischen Entwicklung war die Automatisierung von mehreren gleichzeitig arbeitenden Austauschersystemen. Dazu wurden 6 Systeme (Abb. 5) in einem Förderaggregat (Abb. 4) zusammengefaßt. Die Kolbenstangen der 6 Vorratsflaschen bzw. der 6 Mischflaschen berühren die Stirnfläche eines gemeinsamen Vorschubbalkens, der auf seiner ganzen Länge in gleicher Geschwindigkeit vorbewegt wird. Der Antrieb erfolgt durch einen Synchronmotor über ein mit auswechselbaren Zahnrädern variierbares Getriebe. Eine Wechselautomatik, die alle 15 Sekunden eine neue Durchlaufküvette in den Lichtweg bringt, ermöglicht die alternierende Messung der 6 Eluate. In dieser Anordnung können somit 6 Extrakte gleichzeitig chromatographiert werden, wobei die Eluatextinktionen bei 265 und 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet werden.

Als Austauscherharz wird ein stark basischer Anionenaustauscher verwendet, dessen Matrix aus einem Polymerisat von Styrol und Divinylbenzol im Verhältnis 100:8 besteht. Die stark basischen Eigenschaften erhält das Harz durch Trimethylammonium-Gruppierungen. Der handelsübliche Austauscher (Dowex 1x8, "Fluka") wird nach mehrmaligem Aufschlämmen und Sieben (Porengröße 0,08 mm) mit Ammoniumformiat und konzentrierter Ameisensäure von der Chloridform in die Formiatform überführt. Nach Waschen mit quarzdestilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion ist der Austauscher gebrauchsfertig. Aus einem Druckgefäß mit 6 Ausführschläuchen wird die sedimentierte Dowexsuspension langsam und gleichmäßig in die Chromatographiesäulen gepreßt. Das Füllen von Säulen mit kleinem Querschnitt stellt besondere Anforderungen an die Beschaffenheit des Austauscherharzes. Eine gleichmäßig dichte Packung und damit eine reproduzierbare Auftrennung ist nur mit Austauscherharzen von hohem Vernetzungsgrad und daraus folgender geringer Quellbarkeit zu erreichen. Von den untersuchten Austauscherharzen erwies sich der Dowex 1x8, "Fluka", für unsere Zwecke als besonders geeignet.

Die Adsorption der Extrakte auf die Vorsäulen erfolgt mit einer

gemeinsamen Pumpvorrichtung mit Mikrometergetriebe. Dadurch können kleinste Extraktmengen gleichmäßig, langsam und exakt auf die Säulen gebracht werden, was Vorraussetzung für die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Chromatographie ist. Wegen ihres gegenüber den Hauptsäulen bedeutend größeren Querschnittes, kann die Adsorption auf die Vorsäulen mit geringerem Zeitaufwand erfolgen, als dies bei direkter Adsorption auf die Hauptsäulen möglich wäre. Die Kapazität dieser Vorsäulen wird erst bei Auftragung von Extrakten aus mehr als 50 mg Gewebe überschritten. Eine gut auswertbare Auftrennung der freien Nukleotide wird jedoch bereits bei Einsatz von 3-4 mg Lebergewebe erreicht.

Der Elutionsmodus ist gegenüber den von HURLBERT (33), SCHMITZ (63) und SCHNITGER (64) beschriebenen Verfahren dahingehend geändert, daß nur mit einem Elutionsmittel (Gemisch aus Ameisensäure und Ammoniumformiat) gearbeitet wird. Damit entfällt das früher übliche, mehrmalige Auswechseln der Vorratsflaschen. Durch einen anfangs sehr flachen Gradienten (Abb. 7) wird dem starken Elutionseffekt infolge Anwesenheit von Ammoniumformiat entgegengewirkt. Unter Standardbedingungen wird ein konkaver Gradient durch ein Verhältnis der Pumpgeschwindigkeiten von Mischflasche zu Vorratsflasche wie 5:1 hergestellt. Dadurch verringert sich das Volumen der Mischkammer (zu Beginn 3,92 ml, entsprechend einem Kolbenhub von 0,8 cm) ständig, so daß gegen Ende des Chromatogrammes der Gradient steil ansteigt (Abb. 7). Nach ca. 120 Stunden (Mischkammervolumen 0,392 ml) wird die Mischflaschenpumpe abgestellt. Die Vorratspumpe pumpt jetzt mit der Gesamtfördergeschwindigkeit das Elutionsmittel in die Mischkammer. Ab diesem Zeitpunkt steigen die Konzentrationen im Eluat exponentiell an.

Das Mischungsverhältnis von Ameisensäure zu Ammoniumformiat im Elutionsmittel beeinflußt die relative Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Substanzen. Die Chromatogramme in Abbildung 8 zeigen die Auftrennung bei gleichem Elutionsmodus, jedoch mit verschiedenen Elutionsmitteln. Extinktionsgipfel, die in Chromatogramm 2 (Ameisensäure:Ammoniumformiat = 3:1) deutlich getrennt sind, verschmelzen im Anfangsteil von Chromatogramm 1 (5:1) und im Endteil von Chromatogramm 3 (8:1). Bei der Chromatographie freier Nukleotide in Extrakten von Lebergewebe konnte die

günstigste Auftrennung mit einem Gemisch von 15,2 M Ameisensäure und 4,8 M Ammoniumformiat erreicht werden.

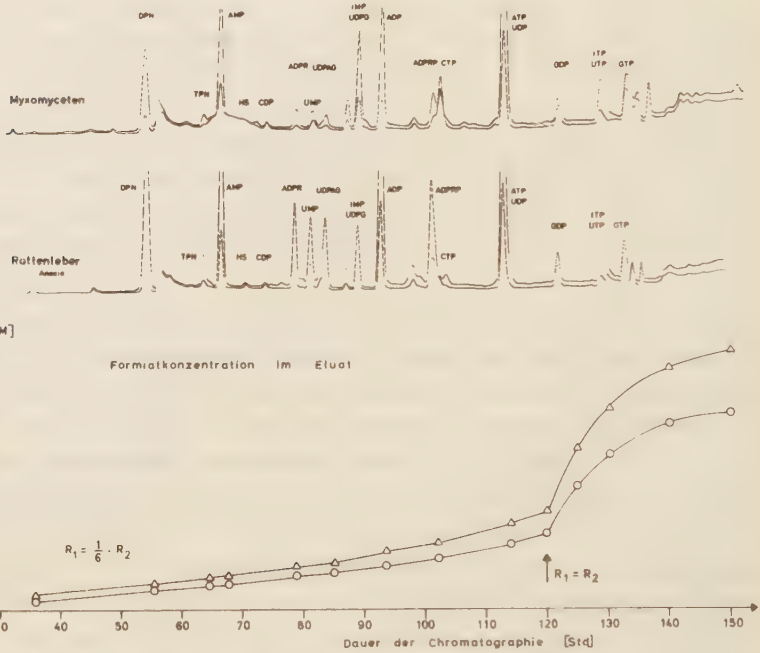

Abbildung 7 Oberer Teil: Chromatographie von Myxomyceten und einem Extract aus 6 mg Lebergewebe unter Standardbedingungen. Unterer Teil: Formiat und Ameisensäurekonzentrationen im Eluat. Von Beginn des Chromatogrammes bis zum Umschaltpunkt nach 120 Std. errechnen sich die Konzentrationen in der angegebenen Gleichung (42):

$$\frac{C}{C_o} = 1 - \frac{a\ \frac{1}{b}}{a + b.t} \qquad a = \frac{V_o}{R_1} \qquad b = 1 - \frac{R_2}{R_1}$$

Nach 120 Std. wird das Mischkammervolumen konstant gehalten. Der Zufluß ist gleich dem Abfluß aus der Mischflasche. Die Konzentrationen errechnen sich ab diesem Zeitpunkt (27,2):

$$\frac{C}{C_o} = 1 - e^{-(\tau + \tau_{anf.})} \qquad \tau = \frac{t}{\frac{Vm}{R}} \quad ; \quad \tau_{anf.} = -\ln\left(1 - \frac{Canf}{C_o}\right)$$

C = Konzentration in der Mischflasche 15,2 M Ameisensäure
C_o = Konzentration in der Vorratsflasche 4,8 M NH_4-Formiat
Canf. = Konzentration in der Mischflasche nach 120 Stunden
R = Gesamtfördervolumen in der Zeiteinheit = $35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml/Std
R_1 = Zufluß zur Mischflasche ($1/6 \cdot R_2$); R2 = Abfluß ($35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml/S
V_o = Mischflaschenvol. zu Beginn (3,92 ml), V_m = Mischflaschenvol nach 120 Std. (0,392 ml); t = Zeit (Std.).

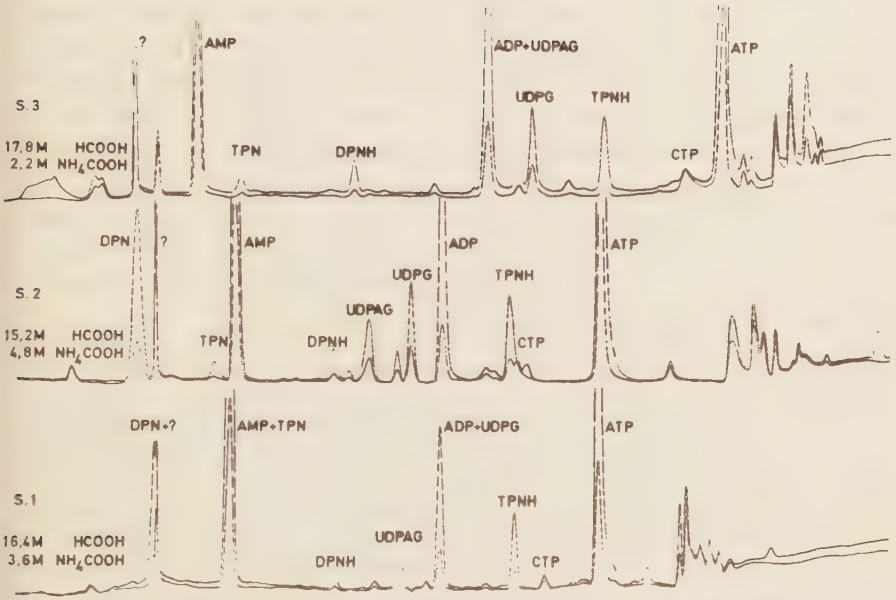

Abbildung 8 Einfluß verschiedener Mischungsverhältnisse von Ameisensäure zu Ammoniumformiat im Elutionsmittel auf die relative Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Nukleotide im Anionenaustauschchromatogramm. Chromatographie von Extrakten aus jeweils 6 mg Lebergewebe.
Elutionsmodus: Elutionsgradient 5:1, (d.i. Verhältnis der Pumpgeschwindigkeit von Mischflasche zu Vorratsflasche); Förderung des Elutionsgemisches: $35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml/Std; Mischflaschenvolumen: 3,92 ml; Austauscherharz: "Dowex" 1x8; kontinuierliche Registrierung der Extinktionen bei 265 und 280 nm.

Identifizierung: Änderungen von Säulenlänge, Elutionsmodus und Elutionsmittel geben ein neues chromatographisches Bild, in dem Reihenfolge und Auftrennung der einzelnen Substanzen zum Teil beträchtlich verändert sein können. Nach Ausarbeitung der Standardbedingungen mußten deshalb die Extinktionsgipfel erneut identifiziert werden. Hinweise auf den typischen Basenanteil

der einzelnen Nukleotide geben die Absorptionsspektren. Wegen ihrer unterschiedlichen Maxima werden sie durch bestimmte Verhältnisse der Absorptionen bei 2 benachbarten Wellenlängen charakterisiert. Die gleichzeitige Registrierung der Extinktionen bei 265 und 280 nm, die bei unserer Methode routinemäßig durchgeführt wird, liefert deshalb erste Hinweise auf die Identität der fraglichen Substanzen. Darüber hinaus kann die Einheitlichkeit eines Extinktionsgipfels aus seinen Quotienten beurteilt werden. In der Tabelle 1 sind die Quotienten Ext. 280/Ext.265nm der hier erfaßten Nukleotide sowie ihre Extinktionskoeffizienten zusammengestellt. Die Daten wurden aus den Absorptionsspektren der PABST-Tabellen (53) berechnet.

Die Identifizierung wurde abgesichert durch Chromatographie der Reinsubstanzen, soweit die in Frage kommenden Nukleotide erhältlich waren. Für diese Untersuchungen wurden Substanzen der Firmen Pabst-Laboratories, Milwaukee, Sigma Chemical Co., St Louis und C.F. Boehringer, Mannheim, herangezogen. Abbildung 9 zeigt als Beispiel die Identifizierung von Uridin-diphosphat-Glukose, die allein und nach Zusatz zu einem Leberextrakt chromatographiert wurde. Bei exakt eingehaltenen Standardbedingungen ist die Lage der Extinktionsgipfel sehr gut reproduzierbar, so daß für die routinemäßige Auswertung jeder Gipfel aus seinem Abstand vom Anfang oder von anderen charakteristischen Punkten des Chromatogrammes identifiziert werden kann. Eine Übersicht über die identifizierten und auswertbaren Nukleotide gibt Abbildung 7, in der Chromatogramme von Extrakten aus Myxomyceten und Rattenleber wiedergegeben sind.

Auswertung: Für die Auswertung spektrophotometrischer Analysen wird benötigt: Schichtdicke, Volumen und Extinktion der Meßlösung, sowie der Extinktionskoeffizient der zu messenden Substanz. Bei der automatischen Registrierung der Extinktionen sind in der Fläche eines Gipfels sowohl die Extinktion als auch das Volumen des Eluats enthalten. Vorraussetzung für eine exakte Volumenberechnung ist ein konstanter Vorschub des Registrierpapiers (0,8 cm pro Stunde) und die konstante Förderung des Elutionsgemisches ($35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml pro Stunde). Der Ausschnitt eines Chromatogrammes in Abbildung 10 soll die Auswertung erläutern.

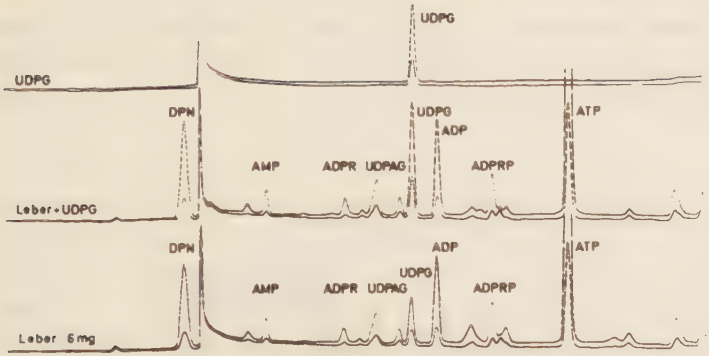

Abbildung 9 Identifizierung von UDP-Glukose.
Oberes Chromatogramm: UDP-Glukose allein;
mittleres Chromatogramm: Zusatz von UDP-Glukose zu einem Leberextrakt; unteres Chromatogramm: Extrakt aus 6 mg Lebergewebe. Austauscherharz: "Dowex" 1x8;
Elutionsmittel: 4,8 M Ammonformiat und 15,2 M Ameisensäure;
Elutionsgradient: 5:1, (d.i. Verhältnis der Pumpgeschwindigkeit von Mischflasche zu Vorratsflasche);
Förderung des Elutionsgemisches: $35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml/Std;
Mischflaschenvolumen: 3,92 ml.

$$\text{Fläche} = \Delta E \cdot V \qquad \frac{\text{Fläche}}{\varepsilon} = \frac{E \cdot V}{\varepsilon \cdot d} \text{ [Mol]}$$

Ordinate: Extinktionsdifferenz: 1 cm ~ $\Delta E = 0{,}05$
Extinktionskoeffizient (z.B. für AMP)
$\varepsilon_{265nm} = 13{,}8 \cdot 10^{6}$ (siehe Tab. 1)

Abzisse: Papiervorschub: 1 cm ~ 1,25 Std.
Durchfluß: $35{,}24 \cdot 10^{-3}$ ml pro Std.
Volumen: 1 cm ~ V = $44{,}1 \cdot 10^{-3}$ ml

Schichtdicke: d = 1 cm

$$1\ cm^2 \sim \frac{0{,}05 \cdot 44{,}1 \cdot 10^{-3}}{13{,}8 \cdot 10^{6}} = 0{,}16 \cdot 10^{-9}\ [\text{Mol}]\ \text{AMP}$$

Die Fläche der einzelnen Gipfel (nach Interpolation der Basislinie) wird durch Planimetrie ermittelt (Planimeter "Aristo",

Nr. 1137 L). Unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktionskoeffizienten (Tab. 1) wird daraus die Anzahl der Mole der betreffenden Substanz im Eluat, bzw. im aufgetragenen Extrakt, berechnet. Die Werte werden auf die Extraktmenge aus 1 g Leber (Frischgewicht) bezogen.

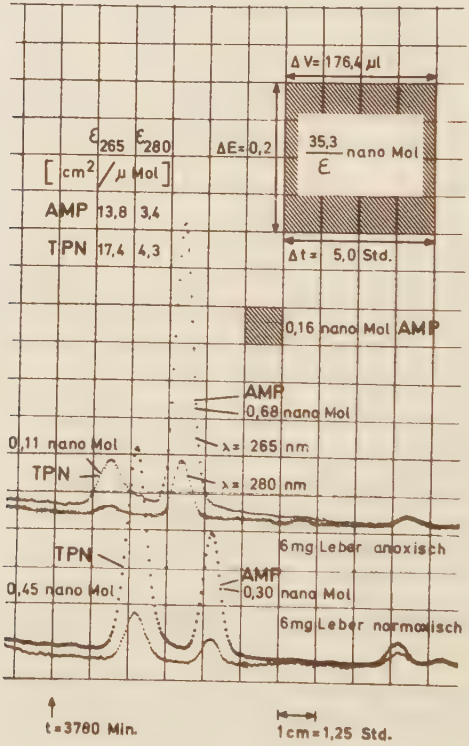

Abbildung 10 Ausschnitt aus der Originalregistrierung eines Anionenaustauschchromatogrammes aus 6 mg normoxischer bzw. anoxischer Leber (Expt. 50).
Kontinuierliche Registrierung der Extinktionen bei 265 nm und 280 nm. Chromatographie unter Standardbedingungen.

2 .4.2. Gewebsextraktion

An eine optimale Gewebsextraktion für Stoffwechseluntersuchungen werden 2 Forderungen gestellt: sofortiges Abstoppen der Stoffwechselreaktionen und vollständiges Herauslösen der zu analysierenden Substanzen. Die im Arbeitskreis von BÜCHER (5) entwickelte Extraktionsmethode enthält:

1. Frierstop des Gewebes mit in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Stanzen (Aluminiumblock, Durchmesser 10 mm, mit gezähnter Schneidekante, Stanztiefe 3 mm).
2. Schneiden des eingefrorenen Gewebes mit einem Mikrotom in 20 µm dicke Scheiben.
3. Wiegen der Gewebsschnitte.
4. Fixieren mit 4 M Perchlorsäure in 40%igem Äthanol (5 ml Extraktionslösung auf 1 g Gewebe).
5. Homogenisieren mit Ultraschall (Branson Sonifier, 20 kHz).
6. Neutralisieren eines Aliquots mit 4 M KOH auf pH 3-4 (PH-Meter H2 Beckmann, automatische Neutralisationsvorrichtung).

Schneiden, Wiegen und Fixieren wird in einer geschlossenen Tiefkühlbox bei -25 bis -28°C, Homogenisieren und Neutralisieren im Eisbad durchgeführt. Die Stoffwechselmetabolite werden bei diesem Verfahren fast vollständig extrahiert, sodaß auf eine Nachextraktion verzichtet werden kann. Das Einfrieren des Gewebes an der Oberfläche der Aluminiumstanze ist so rasch, daß bis in eine Tiefe von 1-1,5 mm keine Veränderungen der energiereichen Triphosphate gegenüber der zuerst eingefrorenen Schicht zu sehen sind (Tab. 2, Abb. 11). Die energiereichen Phosphate reagieren äußerst empfindlich auf die durch Stanzen und Einfrieren ausgelöste Ischaemie. Der Quotient ATP/ADP ist deshalb ein guter Indikator für die Geschwindigkeit des Einfriervorganges. Seine Veränderungen in Schichttiefen über 1,3 mm (Tab. 2) zeigen, daß dieses Gewebe zumindest für Nukleotidanalysen verworfen werden muß.

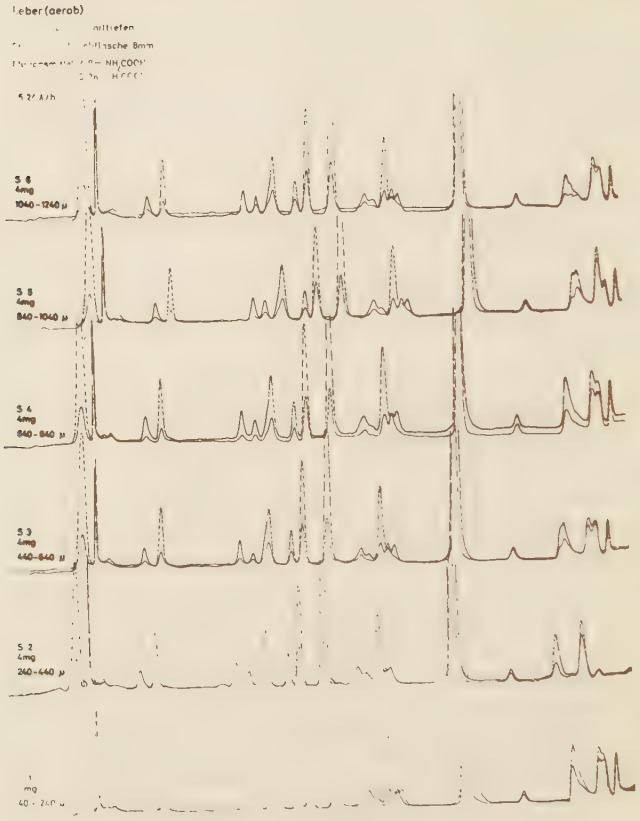

Abbildung 11 Chromatographische Analyse der freien Nukleotide im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Schichttiefe (vergleiche Tab. 2). In allen Chromatogrammen ist die gleiche Gewebsmenge aufgetragen. Zur Identifizierung der einzelnen Gipfel vergleiche Abbildung 7.

2 .5. Metabolitbestimmungen im Perfusat

2 .5.1. Enzymatische und kolorimetrische Methoden

Die enzymatischen Bestimmungen der Metabolite im Perfusat erfolgten nach der Methode des optischen Tests von O. WARBURG (76). DPNH und TPNH absorbieren Licht im nahen Ultraviolett (Maximum bei 340 nm), DPN und TPN dagegen nicht. Änderungen der DPNH- bzw. TPNH-Konzentrationen während eines Reaktionsablaufes können aus der gemessenen Extinktion berechnet werden. Im einfachen optischen Test sind an der Meßreaktion Pyridinnukleotide direkt beteiligt; im zusammengesetzten optischen Test muß die Meßreaktion mit einer Pyridinnukleotid-abhängigen Indikatorreaktion gekoppelt werden. Wenn im Testansatz die Substratkonzentration limitierend ist, so erreicht die Reaktion einen Endwert. Aus der Extinktionsdifferenz läßt sich die Menge der zu messenden Substanz berechnen. Bei Reaktionen, die wegen ungünstiger Lage des Gleichgewichts nicht ablaufen, kann durch Zusatz von Reagenzien, die das Substrat laufend aus dem Gleichgewicht entfernen, ein quantitativer Umsatz erreicht werden.

2 .5.2. Extraktbereitung

1 ml Perfusionslösung wird aus dem Sammelgefäß hinter der Leber entnommen, mit 0,2 ml 2 n Perchlorsäure enteiweißt und mit KOH auf pH 7,6 neutralisiert.

2 .5.3. Zusammensetzung der einzelnen Teste

Die Testansätze 1 und 2 lehnen sich an die von HOHORST (30), WILLIAMSON (77) und GEERKEN (25) angegebenen Methoden an, wurden aber in Einzelheiten modifiziert.

1. L-Lactat, ß-Hydroxybutyrat:

Bei ein und derselben Probe werden nach jeweils abgelaufener Reaktion die Enzyme LDH und ß-HBDH zugegeben.

Puffer: 100 mM As_2O_3, 50 mM Hydrazinsulfat, mit NaOH (carbonatfrei) auf pH 9,6 eingestellt.

Test für Perfusat (d= 1 cm, 366 nm): 0,8 ml Puffer, 0,1 ml Perfusat, 0,05 ml DPN (100 mM), 0,01 ml LDH (1800 IE/ml), 0,01 ml ß-HBDH (15 IE/ml); Endwert nach 45 und 30 min.

Test für Gewebsextrakt (d= 2 cm, 366 nm): 0,6 ml Puffer, 0,4 ml Extrakt, 0,05 ml DPN (150 mM), 0,02 ml LDH (1800 IE/ml); Endwert nach 45 min.

Der Arsen-Hydrazinpuffer (25) hat den Vorteil, daß die Reaktion einen konstanten Endwert erreicht, während mit einem Hydrazin-Glykokollpuffer (30) eine gering rückläufige Kinetik infolge DPNH-Oxydation erreicht wird.

2. Pyruvat, Acetoacetat:

Versuchslösung:

Puffer: 100 mM Triaethanolamin (TRA), 1mM EDTA, mit KOH auf pH 7,6 eingestellt.

Test für Perfusat (d= 1 cm, 366 nm): 0,4 ml Puffer, 0,4 ml Perfusat, 0,01 ml DPNH (30 mM), 0,002 ml LDH (1800 IE/ml), 0,01 ml ß-HBDH (15 IE/ml); Endwert nach 20 und 40 min.

Test für Gewebsextrakt (d= 2 cm, 366 nm): 0,2 ml Puffer, 0,5 ml Extrakt, 0,01 ml DPNH (30 mM), 0,002 ml LDH (1800 IE/ml); Endwert nach 30 min.

3. Ammoniak:

Die Ammoniakbestimmung im Perfusat erfolgt nach der von Kirsten et al. (38) beschriebenen Methode mit Glutamatdehydrogenase.

Versuchslösung:

Puffer: 100 mM TRA, 1 mM EDTA, mit KOH auf pH 7,6 eingestellt.

Test für Perfusat (d= 1 cm, 366 nm): 0,5 ml Puffer, 0,1 ml Perfusat, 0,05 ml DPNH (1,5 mM), 0,02 ml a-Ketoglutarsäure (0,1 M), 0,01 ml GLUDH (30 IE/ml); Endwert nach 15 min.

4. Glukose:

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Testen werden die Bestimmungen von Glukose und Harnstoff im Perfusat nicht über eine DPN-abhängige Reaktion, sondern kolorimetrisch durchgeführt. Glukose wird mit der Glukose-Oxydase-Methode bestimmt (Testkombination Nr. 15982 Fa. Boehringer, Mannheim). Aus Glukose, H_2O und O_2 entstehen unter Einwirkung von Glukose-Oxydase Glucuronsäure und H_2O_2. Wasserstoffperoxyd oxydiert mit Hilfe einer

Peroxydase den Wasserstoff-Donator o-Dianisidin zu einem braunen Farbstoff, der kolorimetrisch bei 430-480 nm gemessen wird.

5. Harnstoff:

Die Harnstoffbestimmung (Testkombination Nr. 15954 Fa. Boehringer, Mannheim) erfolgt mit der durch Urease katalysierten Reaktion, bei der aus Harnstoff und Wasser Ammoniumcarbonat gebildet wird. Die entstehenden Ammonium-Ionen reagieren mit Phenol, Na-Hypochlorit und Nitroprussid-Na und bilden einen blauen Farbkomplex, dessen Farbstoffintensität der Harnstoffkonzentration proportional ist. Gemessen wird bei 530-570 nm.

Abbildung 12 Registrierung der Oberflächen-Fluoreszenz und der Sauerstoffkonzentrationen im Perfusat vor und nach Leberpassage (Expt. 280). Zeitschreibung von rechts nach links. 60-63 min der Perfusion: Durchströmung mit sauerstofffreier Perfusionslösung; 63 min: Umschalten auf sauerstoffhaltige Lösung. Gewebsentnahme durch Frierstop in der Erholungsphase 3 min nach Beendigung der Anoxie.

3. Ergebnisse

3 .1. Metabolitgehalt des Lebergewebes im Anoxiezyklus.

3 .1.1. Durchführung der Experimente

Bei diesen Experimenten wurden Säulenoxygenatoren verwendet: Die Perfusionslösung wurde für die Durchströmung unter aeroben Bedingungen mit einem Gasgemisch von 95% O_2 + 5% CO_2 durchperlt. Das Gesamtvolumen des Systems betrug ca. 500 ml. Ungefähr 15 Minuten vor Anoxiebeginn wurde das von der Leber zurückströmende Medium für die Dauer von 3-4 min in eine zweite, mit Argon durchperlte Säule geleitet. Auf diese Weise wird eine rechtzeitige Umsättigung erreicht. Die für die Anoxie bestimmte Perfusionslösung enthält die Metabolitkonzentrationen, die sich 15 min vorher eingestellt haben. Abbildung 12 ist das Versuchsprotokoll eines von 60 Perfusionsexperimenten dieser Serie. Die Kurven zeigen die kontinuierliche Registrierung der Oberflächen-Fluoreszenz und der Sauerstoffkonzentrationen, die im Perfusat vor und nach Leberpassage gemessen wurden. Bei konstanter Durchströmungsgeschwindigkeit ist der Abstand zwischen den beiden Sauerstoffkurven proportional der Atmungsgröße. Sie beträgt am Anfang dieser Registrierung, nachdem 60 min Perfusion in Normoxie vorausgegangen sind, 231 µgAtom pro Stunde und Gramm. Mit der Sauerstoffregistrierung kann das Einsetzen der Anoxie bzw. der Erholungsphase nach erneuter Sauerstoffzufuhr kontrolliert werden.

Nach Umschalten der Perfusion auf sauerstofffreie Perfusionslösung fallen die Sauerstoffkonzentrationen ab, die Fluoreszenz steigt an. Ihre Kinetik hat den bereits einleitend beschriebenen Verlauf. Durch die langsamere Zeitschreibung sind die bekannten 3 Phasen (1. Latenzphase, 2. schneller Anstieg bei 20 Sekunden, 3. langsamer Anstieg ab 30 Sekunden Anoxie) nicht so deutlich voneinander abgesetzt wie z.B. in Abbildung 1.

Drei Minuten später wird auf sauerstoffhaltiges Medium zurückgeschaltet. Die Fluoreszenzintensität sinkt unmittelbar danach ab; ungefähr 70% des Anoxieanstieges bilden sich in der ersten Minute zurück. Der venöse Sauerstoff dagegen steigt erst eine Minute später an, obwohl arteriell sofort nach Umschalten Voll-

sättigung zu erkennen ist. Auch unter Berücksichtigung, daß die Leber zunächst mit Sauerstoff gesättigt werden muß, ist in der Erholungsphase die Atmung gesteigert und zwar anfangs um fast 20%. Die Ausgangsatmung wird nach 3 min Normoxie noch nicht wieder erreicht. Die Mehratmung beträgt in diesem Zeitraum ungefähr 2 µgAtom Sauerstoff pro Gramm Gewebe. Durch Frierstoptechnik wurden die Gewebsproben zur Analyse entnommen (z.B. im Experiment der Abbildung 12 drei Minuten nach Beendigung der Anoxie).

3.1.2. Pyridinnukleotide

Tabelle 3 und Abbildung 13 zeigen die chromatographischen Analysen der Pyridinnukleotide im Gewebe zu verschiedenen Zeiten des Anoxie-Zyklus. Die Bewegungen des DPNH- und TPNH-Gehaltes sind in Abbildung 13 aufgetragen. Der DPNH-Gehalt steigt nach Einsetzen der Anoxie zuerst nur gering an. Nach ungefähr 20 sec ist eine sprunghafte Zunahme zu erkennen, die nach 30 sec in ein allmähliches Ansteigen übergeht. Unmittelbar nach Sauerstoffzufuhr fällt der DPNH-Gehalt wieder ab; er erreicht nach 3 min jedoch nicht den Ausgangswert. Diese Bewegungen stimmen gut mit der 3-Phasenkintik der Oberflächen-Fluoreszenz überein. TPNH verhält sich dagegen anders. Nach einem sprunghaften Anstieg in den ersten Sekunden, der noch in die Latenzphase der Fluoreszenz fällt, kommt es nach 60 sec zu einem allmählichen Abfall, der auch in der Erholungsphase nicht beschleunigt wird. Nach 3 min ist der TPNH-Spiegel noch stark erhöht. Analysen eine halbe Stunde später zeigen die Rückkehr beider Pyridinnukleotide auf den Ausgangswert.

Tabelle 3 zeigt ebenfalls die Veränderungen des Reduktionsgrades, d.i. der reduzierte Anteil des Diphospho- bzw. Triphospho-Pyridinnukleotidsystems. Da bei der chromatographischen Analyse DPN nicht quantitativ erfaßt wird, wurde eine konstante Summe DPN+DPNH angenommen, die aus der enzymatischen Analyse saurer und alkalischer Gewebsextrakte von Rattenlebern in situ ermittelt wurde (28). In der Normoxie ist ungefähr 9% des Diphosphopyridinnukleotid-Gehaltes reduziert. Nach 3 min sauerstofffreier Durchströmung beträgt der reduzierte Anteil 26%. Er sinkt nach 3 min Sauerstoffzufuhr wieder auf 14% ab. Das Tri-

phosphopyridinnukleotid-System ist schon in der Normoxie zu 76% reduziert. Sein Reduktionsgrad steigt in der Anoxie sehr rasch auf höhere Werte an. Bereits nach 1 min ereicht er mit 89% ein Maximum. Im weiteren Verlauf der Anoxie und in den ersten Minuten der Erholungsphase bleibt er fast unverändert.

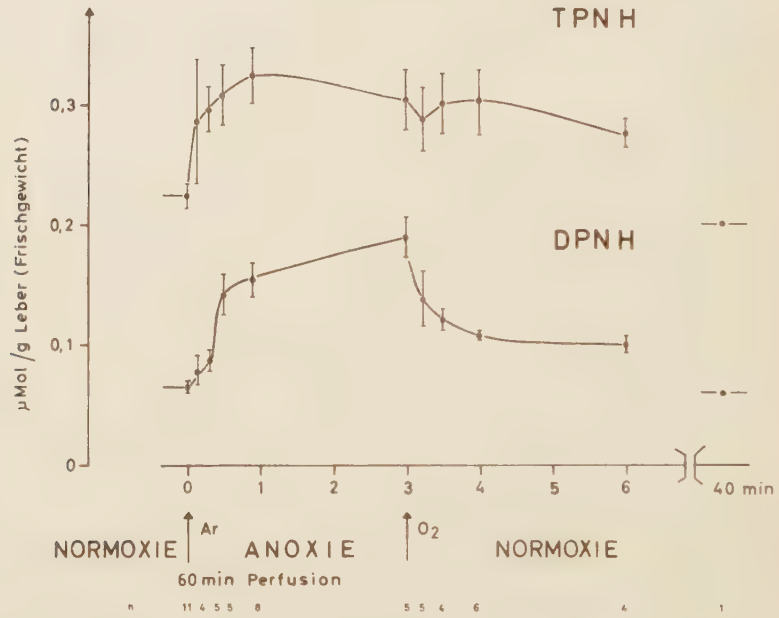

Abbildung 13 Reduzierte Pyridinnukleotide (DPNH,TPNH) im Lebergewebe. Frierstop zu verschiedenen Zeiten des Anoxie-Zyklus. Analyse der säurelöslichen Gewebsextrakte durch Anionenaustauschchromatographie.
DPNH und TPNH werden dabei quantitativ als ADP-Ribose, bzw. als ADP-Ribose-Phosphat erfaßt (11,54).
Analysen aus insgesamt 59 Perfusionsexperimenten (Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Es muß darauf hingewiesen werden, daß mit der Analyse der Gewebsextrakte nur Metabolitgehalte bestimmt werden, die sich aus der Summe freier und gebundener Pyridinnukleotide zusammensetzen. Rückschlüsse auf die effektiven Konzentrationen in den verschiedenen zellulären Kompartimenten können daraus nicht gezogen

werden. Der berechnete Reduktionsgrad stimmt deshalb nicht mit dem tatsächlichen Redoxstatus der Pyridinnukleotide überein. Diese Einschränkung trifft auch für die Gewebsanalyse der energiereichen Phosphate zu.

3.1.3. Energiereiche Phosphate

Die chromatographischen Analysen der Gewebsgehalte der energiereichen Phosphate zu verschiedenen Zeiten des Anoxie-Zyklus sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. In der Anoxie nehmen die Gewebsgehalte der Triphosphate ab, die der Mono- und Diphosphate nehmen zu. In der Erholungsphase bilden sich die Veränderungen wieder zurück.

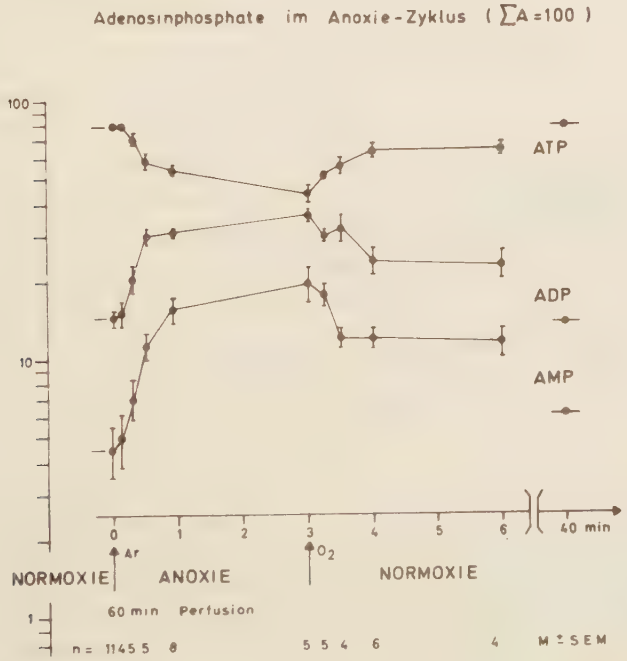

Abbildung 14 Relationen im System der Adenosinphosphate. (Die Summe der Adenosinphosphate wurde gleich 100 gesetzt). Chromatographische Analyse der Mononukleotide in Gewebsextrakten der Anoxie-Serie. (Vergleiche Tab. 4 und 5).

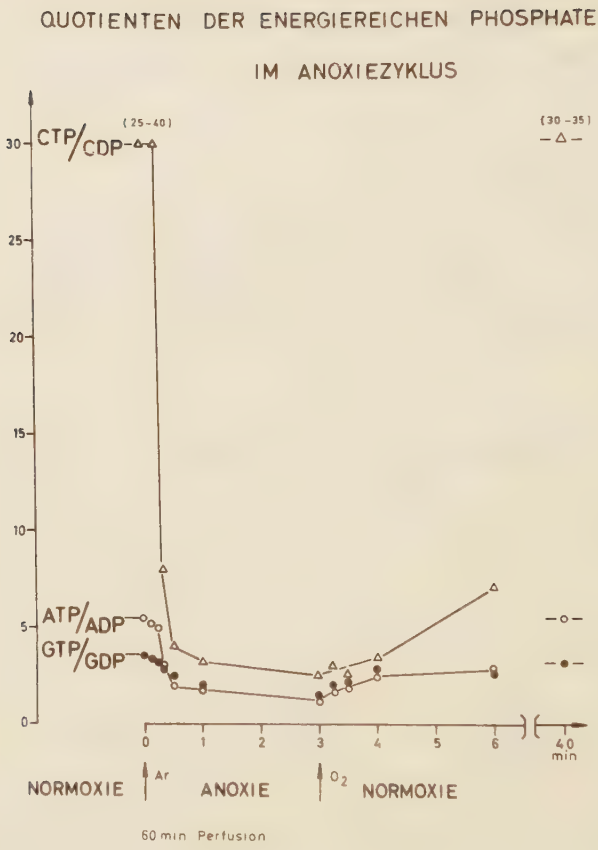

Abbildung 15 Zusammenbruch und Wiederaufbau des Phosphatpotentials im Anoxie-Zyklus. Chromatographische Analyse der Mononukleotide in Gewebsextrakten der Versuchsserie zu Abbildung 12. (Mittelwerte mit Standardabweichungen siehe Tab. 6, Zahl der Proben siehe Abb. 13).

Schwankungen des Bezugswertes (Frischgewicht der Leber) bedingen eine große Streubreite. Einen besseren Einblick in die Veränderungen, als ihn die Gewebsgehalte in Tabelle 4 geben können, liefern die Relationen im System der energiereichen Phosphate. Als Beispiel dazu sind in Abbildung 14 die Adenosinphosphate aufgetragen, deren Summe gleich 100 gesetzt wurde. Auch hier ist eine

Latenzphase von ungefähr 15 sec zu erkennen. Zwischen 15 und 20 sec fällt ATP stark ab; ADP und AMP steigen an. Innerhalb von 15 sec ist dieser Prozeß weitgehend abgelaufen. Die größten relativen Veränderungen sind im AMP-Gehalt zu beobachten, der in 3 min Anoxie um mehr als 400% zunimmt (Tab. 5).

Nach Sauerstoffzufuhr wird das System der energiereichen Phosphate wieder aufgebaut. ATP steigt sofort an, ADP fällt ab. Die Rückbildung des AMP ist dagegen deutlich verzögert. Zu dem Zeitpunkt, an dem AMP verschwindet, ist die Abnahme des ADP verlangsamt; möglicherweise kommt es vorrübergehend sogar zu einem Anstieg. Dieser Befund ist zwar nicht signifikant; er stimmt jedoch mit den bekannten Vorstellungen vom Zusammenspiel der drei Adenosinphosphate überein. Die Rückbildung des AMP setzt den Aufbau des Phosphatpotentials voraus, damit es mit ATP zu ADP phosphoryliert werden kann. Die zeitliche Folge dieser Reaktionen ist in Abbildung 14 zu erkennen.

Die Änderungen der Phosphatpotentiale, repräsentiert durch die Quotienten Tri- zu Diphosphate, sind in Abbildung 15 dargestellt: 15 - 20 sec nach Anoxiebeginn setzt ein rascher Zerfall der energiereichen Phosphate ein. Bemerkenswert ist, daß die Änderungen im System CTP/CDP um eine Größenordnung stärker sind als im System ATP/ADP. Das GTP/GDP-System macht diese Bewegung verzögert und abgeschwächt mit. Nach einer Erholungsphase von drei Minuten ist der Aufbau der ursprünglichen Potentials noch nicht abgeschlossen. Spätestens nach einer halben Stunde ist der Ausgangswert jedoch wieder erreicht (Tab. 6).

3.1.4. Harnsäure

Die Summe der Adenosinphosphate (Tab. 7) läßt während der Dauer der Anoxie und in der Erholungsphase eine abnehmende Tendenz erkennen. Signifikante Unterschiede können jedoch nicht berechnet werden (Normoxie 2580 $\pm$ 180, 3 min Anoxie 2450 $\pm$ 200 nMol pro Gramm). Dieser Hinweis auf einen Abbau der Adeninnukleotide stimmt überein mit dem steigenden Gewebsgehalt der Harnsäure, dem Endprodukt des Purinkatabolismus. Sein Gewebsgehalt ist unter aeroben Bedingungen und zu Beginn einer Anoxie an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze, die bei der Methode der Anionenaustauschchromatographie nach SCHNITGER (65) bei 1 nMol pro Gramm

Gewebe liegt. Bereits nach 30 sec Anoxie ist ein Anstieg zu erkennen, der während der Dauer der sauerstofffreien Durchströmung anhält. Der Gewebsgehalt liegt nach 3 min Anoxie bei 25nMol pro Gramm Gewebe. Er sinkt nach Sauerstoffzufuhr ebenfalls wieder ab und erreicht nach spätestens einer halben Stunde den Ausgangswert.

Abbildung 16 Chromatographische Analyse der freien Nukleotide im Perfusat nach 60 min Leberdurchströmung in Normoxie, nach 1 min und nach 3 min Anoxie.
Oberes Chromatogramm: Perfusionslösung vor Beginn der Leberdurchströmung. Unteres Chromatogramm: Extrakt aus 6 mg Lebergewebe nach 60 min Durchströmung in Normoxie. Chromatographie unter Standardbedingungen.

Nach der chromatographischen Analyse des Perfusates (Abb. 16) treten keine Nukleotide aus den Leberzellen aus. Es wird lediglich Harnsäure gefunden, die sich bei längerer Perfusion unter aeroben Bedingungen geringfügig anhäuft (ca. 0,3 µ Molar). Daraus kann auf einen Purinkatabolismus von 0,01-0,02 µMol pro Stunde und pro Gramm Leber geschlossen werden. In der Anoxie steigt die Harnsäurekonzentration im austretenden Perfusat sofort an. Aus den arterio-venösen Differenzen läßt sich eine Ausschüttung von 1,0-1,5 µMol Harnsäure pro Stunde und pro Gramm berechnen. Der Purinkörperabbau ist demnach unter diesen Bedingungen um 2 Größenordnungen gesteigert. Diese Ausschüttung entspricht während 3 minütiger Anoxie einem Adeninnukleotid-Abbau von etwa 0,1 µMol pro Gramm Leber, der jedoch innerhalb der Streubreite der Summe der Adenosinphosphate liegt (s.o.).

3 .1.5. Uridindiphosphat-Derivate

Mit der Anionenaustauscherchromatographie werden Uridindiphosphat-Glukose und - Acetylglukosamin quantitativ erfaßt (Tab. 8). Diese beiden Nukleotide des Kohlenhydratanabolismus bleiben während der Anoxie unverändert. In der anschließenden Normoxie ist ein Z uwachs im Gewebsgehalt der UDP-Glukose angedeutet. Der weitgehend konstante Gewebsgehalt dieser Nukleotide macht eine gerichtete Änderung des Bezugswertes (d.i. Frischgewicht der Leber) während der Anoxie unwahrscheinlich. Die abnehmende Tendenz der Adenosinnukleotide scheint deshalb einen echten Abbau anzudeuten.

3 .2. Metabolitkonzentrationen im Perfusat

3 .2.1. Durchführung der Experimente

Die Experimente dieser Serie wurden mit zirkulierender Perfusionslösung durchgeführt, deren Gesamtvolumen 200 ml betrug. Bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 30-40 ml pro Minute mußte demnach mit einer Umlaufzeit von 5-6 min gerechnet werden. Mit Hilfe einer Umwälzpumpe in einem kurzgeschlossenen Kreislauf konnte jedoch erreicht werden, daß sich metabolische Änderungen der Leber mit nur geringer Verzögerung der gesamten Perfusionslösung mitteilten.

Die Ausbildung eines Systems Lebergewebe-Perfusat ist erforderlich, wenn aus den Metabolitkonzentrationen im Perfusat Rückschlüsse auf die Vorgänge im Lebergewebe gezogen werden sollen. Auslenkungen aus dem stationären Zustand können dabei um so genauer verfolgt werden, je schneller der Ausgleich zwischen den beiden Räumen dieses Systems erfolgt.

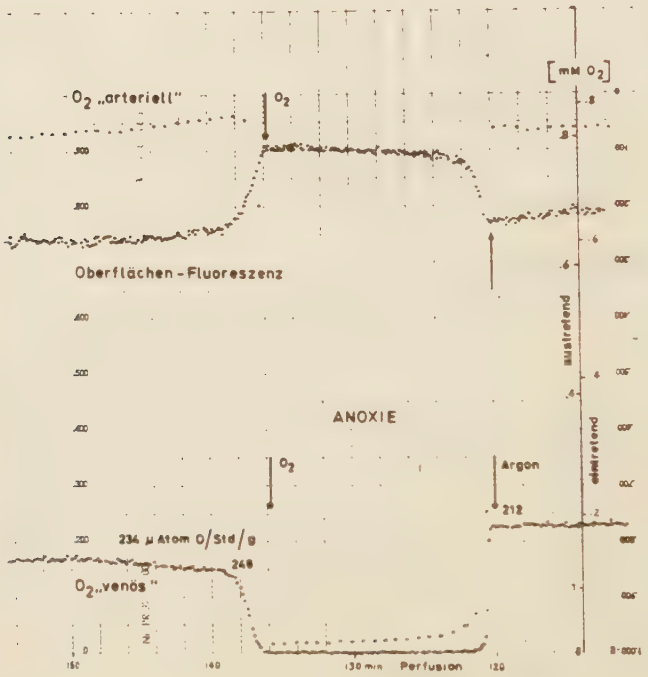

Abbildung 17 Registrierung der Oberflächen-Fluoreszenz und der Sauerstoffkonzentrationen im Perfusat vor und nach Leberpassage. (Expt. 339). Zeitschreibung von rechts nach links.
120-136 min der Perfusion: Durchströmung mit sauerstofffreier Perfusionslösung.

Zur Aufsättigung wurde ein Zylinderoxygenator verwendet, der während der Normoxie mit einem Sauerstoff-Kohlendioxyd-Gemisch, bzw. zur Erzielung einer Anoxie mit einem Argon-Kohlendioxyd-Gemisch durchströmt wurde. Jeweils eine halbe Minute vor Anoxiebeginn wurde die Durchströmung des Oxygenators von Sauerstoff auf Argon umgeschaltet. Innerhalb von 20-30 sec war die Perfusionslösung zu mehr als 90% sauerstofffrei (Abb. 17). In der Erholungsphase wurde mit dem entsprechenden Gasgemisch umgesättigt.

Abbildung 17 zeigt die Registrierung von Sauerstoffkonzentrationen und Fluoreszenzintensität in einem typischen Experiment dieser Serie. Vor Anoxiebeginn, nachdem die Leber zwei Stunden unter aeroben Bedingungen perfundiert worden war, beträgt die Atmungsgröße 212 µg Atom Sauerstoff pro Stunde und Gramm. Sauerstoff- und Fluoreszenzkurven zeigen im Anoxiezyklus den bereits beschriebenen Verlauf: Absinken der Sauerstoffkonzentrationen; Anstieg der Fluoreszenzintensität mit schneller und langsamer Phase; nach Sauerstoffzufuhr Rückbildung des Fluoreszenzanstieges und Steigerung des Sauerstoffverbrauches. Diese beiden Parameter verhalten sich somit in der Langzeit-Anoxie in gleicher Weise wie in dem Anoxie-Zyklus von kürzerer Dauer.

3.2.2. Lactat und Pyruvat

Die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat im Perfusat, sowie ihr Verhältnis, sind in Tabelle 9 angegeben. Im Perfusat werden von der Leber charakteristische Spiegel dieser Substrate aufgebaut. Nach zweistündiger Perfusion unter aeroben Bedingungen ist nur noch eine geringe Konzentrationsänderung festzustellen. Bei Übergang auf anaerobe Bedingungen steigt Lactat sehr rasch an; Pyruvat fällt ab. Nach Sauerstoffzufuhr bleiben die erhöhten Lactatkonzentrationen bestehen; Pyruvat dagegen steigt auf Werte an, die über denen zu Beginn der Anoxie liegen. Diese Bewegungen sind zusammen mit denen des Substratpaares ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat in Bild 18 dargestellt, wobei für die Konzentrationen ein logarithmischer Maßstab gewählt wurde. Aus dem Abstand der korrespondierenden Kurven läßt sich das jeweilige Verhältnis reduzierter zu oxydierter Partner ablesen.

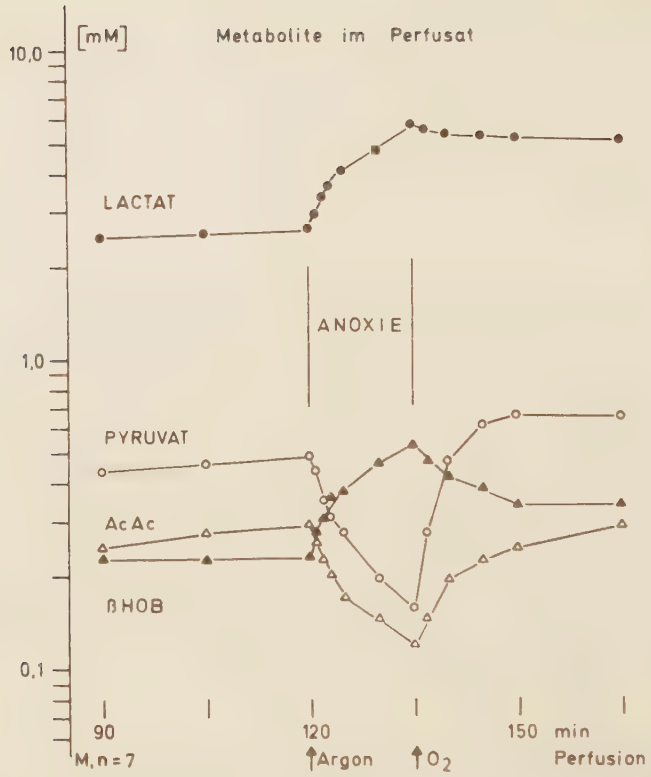

Abbildung 18 Konzentrationen von Lactat, Pyruvat, ß-Hydroxybutyrat und Acetoacetat (mM) im Perfusat. Mittelwerte aus 7 Experimenten. Nach 120 min wurde die Leber für die Dauer von 15 min mit sauerstofffreier Perfusionslösung durchströmt.

3 .2.3. ß-Hydroxybutyrat und Acetoacetat

Um eine exakte Messung des Substratpaares ß-Hydroxybutyrat und Acetoactat durchführen zu können, wurden dem Perfusat zu Perfusionsbeginn 0,4 mMolar Acetoacetat zugesetzt; diese Menge wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Spätestens nach drei Kreisläufen ist ein Gleichgewicht zwischen Leber und Perfusat

eingestellt, so daß das Verhältnis ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat konstant bleibt. Unter normoxischen Bedingungen erhöhen sich die Konzentrationen nur unbedeutend (vergleiche auch Kontrollversuche Tabelle 10). In Übereinstimmung mit den Veränderungen von Lactat und Pyruvat steigt die ß-Hydroxybutyratkonzentration an, die Acetoacetatkonzentration nimmt ab. In der anschließenden Erholungsphase bilden sich diese Veränderungen langsam zurück, wobei im Gegensatz zum Lactat ß-Hydroxybutyrat wieder verschwindet, so daß die Konzentration vor Anoxiebeginn annähernd eingestellt wird.

3.2.4. Redoxsysteme

In den Konzentrationsänderungen dieser Substratpaare im Perfusat spiegeln sich Redoxvorgänge im Gewebe wieder. Einen Anhalt geben die Quotienten der reduzierten zu oxydierten Partner. Ein Anstieg des Quotienten ß-HOB/AcAc, bzw. L/P bedeutet eine Erhöhung des Wasserstoffdruckes in dem betreffenden Redoxsystem. Wegen der engen Kopplung dieser Substratpaare mit dem jeweiligen DPNH-DPN-System wird dadurch die vermehrte Wasserstoffbeladung der Pyridinnukleotide angezeigt. Die vermittelnden Enzyme, Lactat-Dehydrogenase bzw. ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, sind ausschließlich im extra-, bzw. im intramitochondrialen Raum der Zelle lokalisiert. Änderungen der Redoxquotienten geben deshalb Hinweise für Redoxvorgänge in verschiedenen Kompartimenten.

Unter aeroben Bedingungen stellt sich im Lactat-Pyruvat-System ein Quotient von ungefähr 6 ein. Nach 5 min sauerstofffreier Durchströmung ist er auf 16 und nach 15 min auf über 40 angestiegen. Gleichzeitig steigt der Quotient ß-HOB/AcAc von Werten um 1 auf Werte um 4 an. In der anschließenden Normoxie bildet sich die Veränderung wieder zurück. Der Quotient L/P beträgt 15 min später bereits 8, während der Quotient ß-HOB/AcAc erst auf 1,5 abgefallen ist.

Um die Veränderungen der Quotienten L/P und ß-HOB/AcAc miteinander vergleichen zu können, müssen sie auf die ihnen zugrunde liegenden Verschiebungen der Redoxpotentiale zurückgeführt werden. Das "Ist-Potential" der Redoxsysteme kann aus den Konzentrationen der Substratpaare folgendermaßen berechnet werden:

$$E' = E_o' - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{RED}{OX}$$

E_o = Normalpotential unter Standardbedingungen, (Konzentration der Reaktionspartner = 1 molar; pH = 0; T = 25°C = 298°K; P = 1 ATM

E_o' = Normalpotential unter "physiologischen" Stanardbedingungen, (pH = 7,0; T = 37°C = 310°K).

R = Gaskonstante = 1,987 cal·grad^{-1}·Mol^{-1}

K = absolute Temperatur (Grad Kelvin)

n = Zahl der Elektronen, die in den Redoxreaktionen übertragen werden.

F = Faradaysche Konstante = 23608 cal·Volt^{-1}·Mol^{-1}

RED = Konzentration des reduzierten Partners (Lactat, ß-Hydroxybutyrat)

OX = Konzentration des oxydierten Partners (Pyruvat, Acetoacetat)

ln a = 2,303 log a

$$E' = E_o' - \frac{1{,}987 \cdot 310 \cdot 2{,}303}{2 \cdot 23{,}608 \cdot 10^3} \lg \frac{RED}{OX} = E_o' - 30{,}7 \lg \frac{RED}{OX} \text{ mVolt}$$

Für die Berechnung der "Ist-Potentiale" wurden den einzelnen Substratpaaren folgende Normalpotentiale zugrunde gelegt:

Lactat-Pyruvat: $E_o' = -204$ mVolt (4)

ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat: $E_o' = -270$ mVolt (40)

Abbildung 19 zeigt die Auftragung der errechneten Redoxpotentiale im Anoxie-Zyklus. Unter anaeroben Bedingungen werden beide Redoxpotentiale negativer. In einer 15 min dauernden Anoxie steigt das Potential des Lactat-Pyruvat-Systems von -226 auf -254 mVolt und das Potential des ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat-Systems von -267 auf -289 mVolt an. Die stärksten Änderungen finden offensichtlich kurz nach Übergang zur Anaerobiose statt, während bei länger dauernder Anoxie die Redoxvorgänge in diesen Systemen langsamer ablaufen. Nach Sauerstoffzufuhr bildet sich die Negativierung langsam zurück. Die Redoxpotentiale sind allerdings 15 min später noch deutlich negativer als im Ausgangszustand.

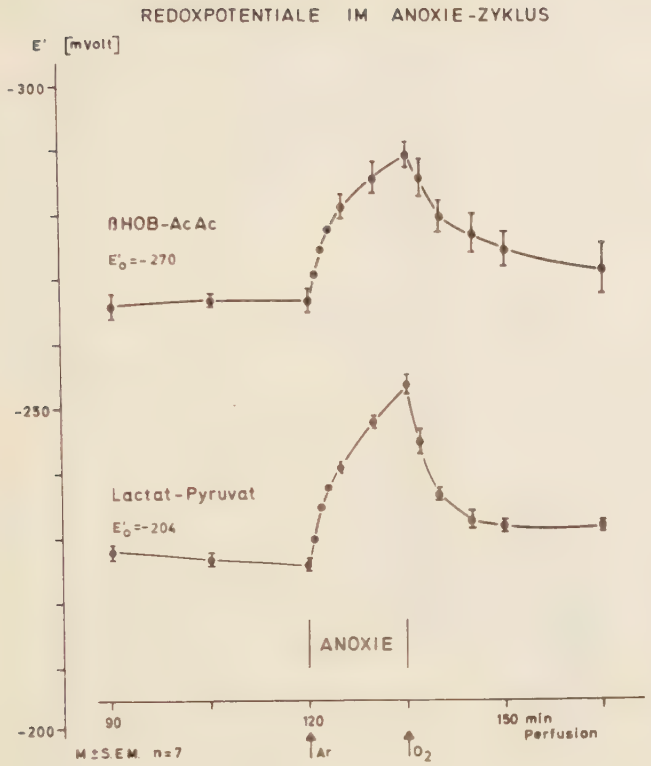

Abbildung 19 Bewegungen der Redoxpotentiale im Anoxie-Zyklus, berechnet aus den Quotienten der Substratkonzentrationen im Perfusat (ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat, Lactat/Pyruvat).

$$E' = E'_o - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{RED}{OX} = E'_o - 30{,}7 \cdot \lg \frac{RED}{OX} \text{ mVolt} \quad (4)$$

Normalpotentiale (E'_o) bei 37°C, pH 7,0.

In Abbildung 20 ist der Potentialzuwachs in den Systemen Lactat-Pyruvat und ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat gegeneinander aufgetragen. Einer Änderung auf der Abzisse entspricht eine annähernd gleich große Änderung auf der Ordinate. Diese Darstellung macht deutlich, daß an den Redoxvorgängen in der Anoxie

beide Systeme in fast gleicher Weise beteiligt sind. Bei der Rückbildung der Negativierung in der Erholungsphase scheint eine geringe Verzögerung im System ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat vorzuliegen. Wie oben ausgeführt wurde, können diese Redoxsysteme verschiedenen zellulären Räumen zugeordnet werden. Die vorliegenden Analysen lassen deshalb vermuten, daß in der Anoxie der Wasserstoff sich in fast gleicher Stärke im intra- und extramitochondrialen Raum anstaut.

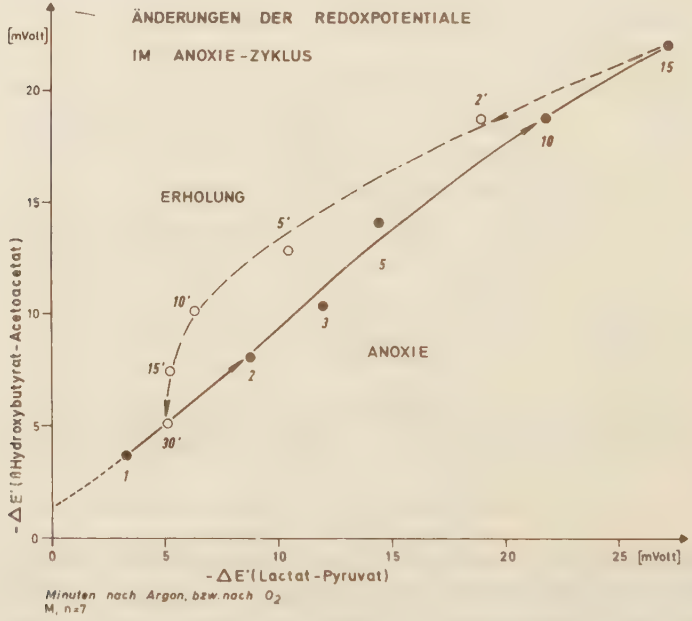

Abbildung 20 Änderungen der Redoxpotentiale in den Systemen Lactat-Pyruvat (Abzisse) und ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat (Ordinate). Mittelwerte aus Abb. 19. Potential bei 120 min Perfusion = 0. Potentialzuwachs in mVolt. Zahlen an der Kurve: Minuten nach Argon- und Sauerstoffzufuhr.

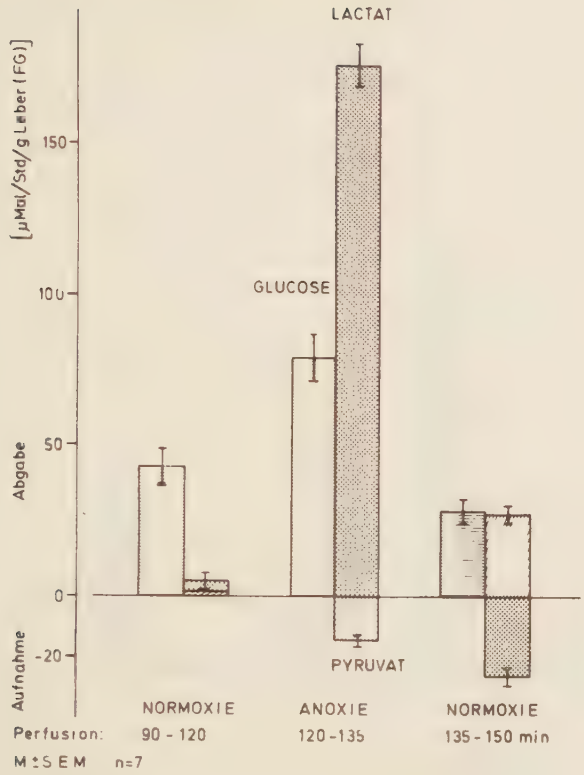

Abbildung 21 Glykolyse und Glykogenolyse:
Abgabe bzw. Aufnahme von Glukose, Lactat und Pyruvat (µMol pro Stunde und Gramm Frischgewicht) bei Lebern von normal gefütterten Ratten, perfundiert im geschlossenen System. Aufgetragen sind die Ergebnisse vor, während und nach einer 15 min dauernden Anoxie.

3 .2.5. Glykolyse

Die Konzentrationsänderungen spiegeln nicht nur Redoxvorgänge wieder; sie geben ebenfalls einen Einblick in die katabolischen Vorgänge während der Anoxie. Lactat und Pyruvat sind das Endprodukt der Glykolyse. Die Geschwindigkeit ihrer Ausschüttung

in das Perfusat ist ein Maß für den Durchsatz dieser Stoffwechselkette. Im Zusammenhang mit der Einstellung von Metabolitspiegeln im Perfusat ist die aerobe Glykolyse in der ersten Perfusionsstunde sehr hoch. Sie bildet sich allmählich zurück und beträgt in der zweiten Stunde nur noch 5 µMol pro Gramm Leber (Tabelle 11). Unmittelbar nach Übergang auf anaerobe Bedingungen ist die Ausschüttung von Lactat und Pyruvat erheblich gesteigert. Der mittlere Wert von 160 µMol pro Stunde und Gramm kann als ein Maß für die Aktivität des Embden-Meyerhoff-Weges in der perfundierten Leber angesehen werden. Die Stimulierung der Glykolyse fällt nach erneuter Zufuhr von Sauerstoff weg. Die Leber gibt jetzt Lactat an das Perfusat ab und nimmt gleiche Mengen Pyruvat auf, so daß die Bilanz weitgehend ausgeglichen ist.(Abbildung 21).

3 .2.6. Glykogenolyse

Eine charakteristische Erscheinung bei der Perfusion glykogenreicher Lebern ist die Abgabe von Glukose an das Perfusat. Nach dem Verlauf der Kontrollexperimente scheint bei längerer Perfusion ein Spiegel eingestellt zu werden, der weit über einem normalen Blutzuckerspiegel der Ratte liegt (35)(Tabelle 12). Da unter diesen Bedingungen eine Glukoneogenese zu vernachlässigen ist, muß die Glukoseausschüttung durch Glykogenolyse verursacht sein, zumal eine entsprechende Abnahme des Glykogengehaltes gefunden wurde (39). In diesen Experimenten geben die Lebern in der zweiten Perfusionsstunde noch etwa 40 µMol Glukose pro Gramm Gewebe ab. In der anschließenden Anoxie ist die Ausschüttung auf mehr als das Doppelte gesteigert. Analog zur Glykolyse dauert auch die Stimulierung der Glykogenolyse nach Sauerstoffzufuhr nicht an. Die Glukoseausschüttung geht auf Werte zurück, die ebenfalls in den Kontrollexperimenten gemessen werden.

3 .2.7. Ketogenese

Bei den beschriebenen experimentellen Bedingungen ist nur eine geringe Ketogenese der Leber zu erkennen, die weniger als 1 µMol pro Stunde und Gramm Leber beträgt (Tab. 13). Die vermehrte Bildung von ß-Hydroxybutyrat während der Anoxie scheint

über die Redoxveränderungen hinauszugehen, so daß die Ketogenese möglicherweise gesteigert ist. Dieser Befund ist jedoch nicht signifikant, sowohl in Hinblick auf Kontrollexperimente als auch auf die Phase unmittelbar vor der Anoxie. Methodische Fehler sind nicht ausgeschlossen.

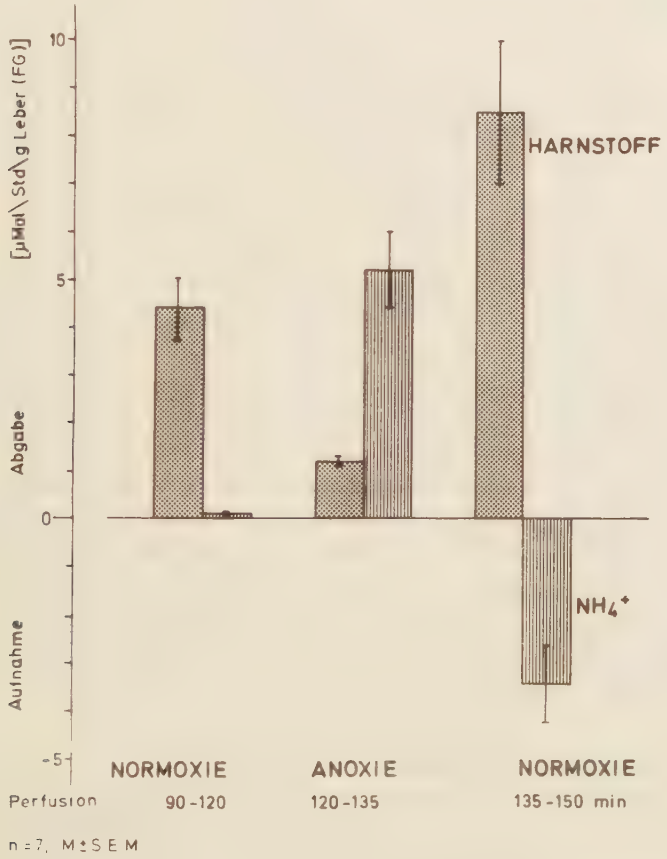

Abbildung 22 Harnstoffsynthese.
Abgabe bzw. Aufnahme von Harnstoff und Ammoniak (µMol pro Stunde und Gramm (FG)) bei lebern von normal gefütterten Ratten, perfundiert im geschlossenen System. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen vor, während und nach einer 15 min dauernden Anoxie.

3 .2.8. Harnstoffsynthese und Proteinkatabolismus

Während einer dreistündigen Perfusion unter aeroben Bedingungen bleibt die Harnstoffsynthese der Leber weitgehend konstant, (Tabelle 14) Ammoniak wird dabei nur in geringer Menge freigesetzt, so daß auch bei längerer Perfusion eine Konzentration von 0,1 mmolar nicht überschritten wird. Die hämoglobinfrei perfundierte Leber ist somit in der Lage, den im Protein- und Aminosäure-Katabolismus anfallenden Stickstoff sofort als Harnstoff zu binden. Aus der Harnstoff- und Ammoniakausscheidung kann auf einen Proteinkatabolismus von 0,5 mg pro Stunde und Gramm Leber geschlossen werden. Nach dreistündiger Perfusion müßte demnach ungefähr 1% des Leberproteins metabolisiert worden sein.

Der Proteinkatabolismus, bzw. die Freisetzung von Amino-Stickstoff, läuft in der Anoxie unverändert weiter (Tabelle 15). Die Harnstoffsynthese ist infolge der gestörten Energetik jedoch unterbunden, so daß der freigesetzte Ammoniak in das Perfusat ausgeschieden wird. Die geringe Harnstoffausschüttung, die in einem Zeitraum von 15 min Anoxie noch gemessen wird, beruht wahrscheinlich auf keiner Neusynthese, sondern auf einer Auswaschung des Gewebes. Die Harnstoffsynthese setzt nach Sauerstoffzufuhr sofort wieder ein (Abb. 22). Sie ist solange gesteigert, bis die erhöhten Ammoniakkonzentrationen abgebaut sind. Die vermehrte Abgabe von Amino-Stickstoff in der Erholungsphase läßt vermuten, daß durch die Anoxie ein gesteigerter Proteinkatabolismus ausgelöst wird.

3 .2.9. Sauerstoffverbrauch

Im Versuchsprotokoll der Abbildung 17 war zu erkennen, daß der Sauerstoffverbrauch in der Erholungsphase nach einer Anoxie gesteigert ist. Im oberen Absohnitt der Abbildung 23 ist die mittlere Atmungsgröße (/ug Atom Sauerstoff pro Stunde und Gramm Leber) aus 6 Experimenten dieser Serie angegeben. Der untere Abschnitt enthält die Atmungssteigerung in Prozent der Ausgangsatmung.

Unmittelbar nach Anoxie wird eine zu hohe Atmungssteigerung berechnet. Sie enthält zusätzlich den Sauerstoff, mit dem das Lebergewebe wieder "aufgefüllt" werden muß. Dieser Prozeß ist jedoch nach spätestens 2 Minuten abgeschlossen. Zu diesem

Zeitpunkt beträgt die echte Atmungssteigerung ungefähr 10%. Im Laufe von 15 min geht sie auf 3% zurück. In dieser Zeit verbraucht die Leber zusätzlich 3-4 µg Atom Sauerstoff pro Gramm Gewebe.

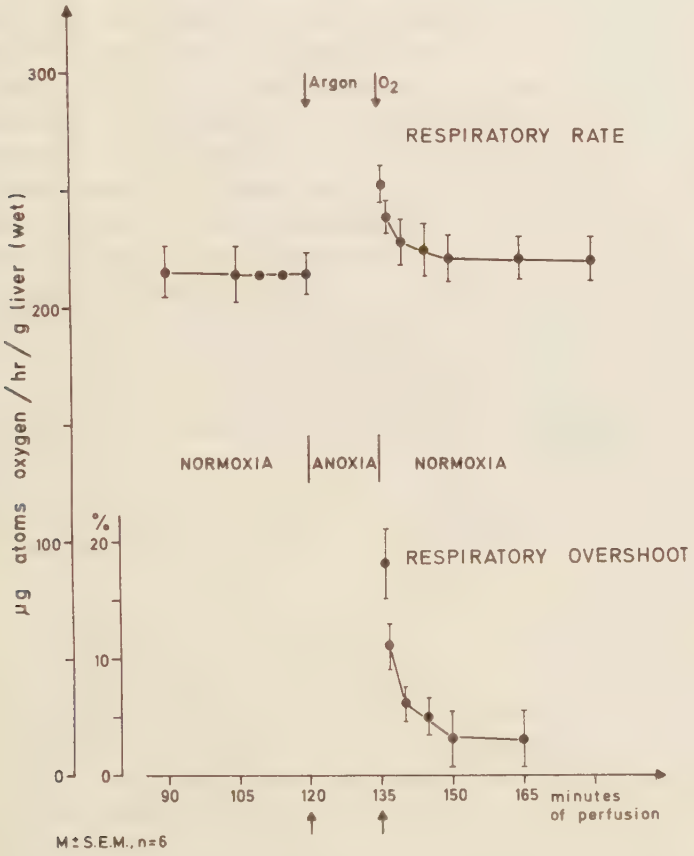

Abbildung 23 Sauerstoffverbrauch in der Erholungsphase nach einer 15 min dauernden Anoxie.
Oberer Abschnitt: Atmungsgrößen (Mittelwerte mit Standardabweichungen) aus 6 Anoxieexperimenten.
Unterer Abschnitt: Atmungssteigerung in der Erholungsphase in Prozent der Ausgangsatmung.

3 .2.10. Kontrollperfusionen

Die Veränderungen der Metabolitkonzentrationen und des Metabolitaustausches mit dem Perfusat während der Anoxie und Erholungsphase werden mit Kontrollexperimenten verglichen, in denen die Leber drei Stunden unter Standardbedingungen perfundiert wurde. Kontroll- und Anoxieserie weichen in vergleichbaren Zeiträumen bei einigen Parametern stark voneinander ab. Diese Diskrepanzen gehen teilweise sogar über den Bereich der Streubreite der Mittelwerte (S.E.M.) hinaus. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die Experimente der Kontrollserie drei Monate nach Beendigung der Anoxieversuche durchgeführt wurden. Trotz genauer Einhaltung der Standardbedingungen (wie z.B. Perfusionslösung, Temperatur, Tageszeit, Geschlecht und Alter der Tiere, Operationstechnik usw.) muß ein unterschiedlicher Ausgangszustand angenommen werden. Möglicherweise spielen jahreszeitliche Einflüsse auf das Tiermaterial eine Rolle. Für den Vergleich dieser beiden Serien sind deshalb weniger die absoluten Meßwerte, sondern vielmehr die Bewegungen der einzelnen Parameter während der Perfusion entscheidend.

4. Diskussion

In der Gewebsanoxie wird den Mitochondrien der Sauerstoff als Elektronenakzeptor der Atmungskette entzogen. Die respiratorischen Pigmente stehen dann ausschließlich unter dem Einfluß des Substratwasserstoffs, dessen Elektronen an zwei Stellen (Diphosphopyridinnukleotid und Flavinadenindinukleotid) in die Kette einfließen. In vorausgegangenen Untersuchungen (45) an der hämoglobinfrei perfundierten Leber wurde gezeigt, daß bei Sauerstoffentzug die Cytochrome nach einer kurzen Latenzphase innerhalb weniger Sekunden reduziert werden. In einer Kette von vollständig reduzierten Redoxmediatoren sistiert der Elektronenfluß. Der Wasserstoff, dessen Freisetzung in den katabolischen Prozessen zunächst weiterläuft, staut sich deshalb in den verschiedenen Redoxsystemen an, die der Atmungskette vorgelagert sind. Bei fehlendem Elektronenfluß sind weiterhin keine oxydativen Phosphorylierungen möglich. Das Gleichgewicht zwischen Bildung und Verbrauch energiereicher Phosphate, das im stationären aeroben Zustand der Leberzelle besteht, ist gestört. Die direkten Folgen der Anoxie sind deshalb 1.) Wasserstoffanstau und 2 .) Zusammenbruch der Energetik.

4 .1. Wasserstoffanstau

Der Anstau des Wasserstoffs in der Anoxie und seine Rückbildung nach erneuter Sauerstoffzufuhr wurde bei der hämoglobinfrei perfundierten Leber an folgenden Parametern untersucht: Gewebsgehalt der reduzierten Pyridinnukleotide, Intensität der Oberflächen-Fluoreszenz und Konzentration von Substratpaaren im Perfusat.

Diese einzelnen Parameter haben einen unterschiedlichen Aussagewert. Sie ergänzen sich aber zu einem umfassenden Bild der Redoxvorgänge im Gewebe. Der Gewebsgehalt stellt eine Momentaufnahme des Stoffwechselzustandes dar, wobei der Vergleich mit den vorausgegangenen und nachfolgenden Zuständen fehlt. Die Oberflächen-Fluoreszenz, sowie die Analyse von Substratpaaren im Perfusat ermöglichen dagegen eine kontinuierliche Registrierung von Redoxänderungen, ohne die Integrität des

Gewebes zu verletzen. Gewebsgehalt und Oberflächen-Fluoreszenz erfassen beide die Summe der freien und gebundenen reduzierten Pyridinnukleotide in sämtlichen zellulären Räumen. Sie geben keine Hinweise auf die verschiedenen Redoxsysteme, in denen sich der Wasserstoff anstaut. Substratpaare, die mit diesen Systemen in Verbindung stehen und die in das Perfusat austreten, erlauben jedoch, bei Redoxänderungen zwischen den einzelnen Kompartimenten zu unterscheiden. Die Methode der "indirekten" Potentialmessung setzt allerdings einen raschen und gleichmäßigen Diffusionsausgleich zwischen intra- und extrazellulären Raum, sowie eine schnelle Gleichgewichtseinstellung der Redoxreaktionen voraus.

Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzregistrierung ist durch die Tatsache erschwert, daß die Fluoreszenzausbeute nicht nur von zellulären Konzentrationen der reduzierten Pyridinnukleotide, sondern auch von deren Bindung an Enzymproteine (19) und vom energetischen Zustand der Mitochondrien abhängt (21). Außerdem können nicht die Anteile von DPNH und TPNH unterschieden werden. Die Veränderungen im Gewebsgehalt des DPNH während des Anoxie-Zyklus zeigen jedoch dieselben charakteristischen Bewegungen, die von der Fluoreszenzregistrierung bekannt sind. Die entsprechenden Bewegungen des TPNH-Gehaltes weichen dagegen von diesem Verlauf deutlich ab. Der Schluß ist deshalb berechtigt, daß kurzzeitige Fluoreszenzänderungen, wie z.B. in der Anoxie, vorwiegend Änderungen des DPNH-Gehaltes wiederspiegeln.

Beim Übergang zur Anaerobiose steigt der TPNH-Gehalt noch vor dem DPNH-Gehalt an und erreicht in wenigen Sekunden ein Maximum. Der DPNH-Gehalt dagegen nimmt erst nach einer Latenzphase sprunghaft zu. Bei länger dauernder Anoxie läuft die Reduktion des Diphosphopyridinnukleotides mit verminderter Geschwindigkeit weiter, während im Triphosphopyridinnukleotid-System bereits eine Tendenz zur Oxydation zu erkennen ist. Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Pyridinnukleotide ist möglicherweise Ausdruck ihrer verschiedenen Stellung im Metabolismus. Wasserstoff kann wahrscheinlich nur unter Energieverbrauch von DPNH auf TPN übertragen werden, da das Triphosphopyridinnukleotid-System ein negativeres Redoxpotential (4)

aufweist. Die TPNH-Bildung zu Beginn der Anoxie muß deshalb abgeschlossen sein, wenn der Zerfall der energiereichen Phosphate vollständig ist. Andererseits ist der Wasserstoffakzeptor des TPNH nicht die Atmungskette, sondern energieverbrauchende Prozesse, z.B. Biosynthesen, die erst nach Aufbau des ursprünglichen Phosphatpotentials wieder anlaufen können. Die Bewegungen der energiereichen Phosphate während des Anoxie-Zyklus stimmen mit dieser Vorstellung überein.

Die Konzentrationsverschiebungen Diphosphopyridinnukleotid-abhängiger Substratpaare im Perfusat während der Anoxie zeigen, daß sich der Wasserstoff in den Redoxsystemen anstaut, mit denen ß-Hydroxybutyrat-Acetoacetat und Lactat-Pyruvat in Verbindung stehen. Wegen ihrer Stellung in einer "Sackgasse" des Intermediärstoffwechsels und wegen der Lokalisation und der relativ hohen Aktivität ihrer vermittelnden Dehydrogenasen können diese Paare als Redoxindikatoren des mitochondrialen Raumes (40), bzw. des Cytosols+) (4,31,32) angesehen werden. Die Potentiale der intra- und extramitochondrialen Redoxsysteme, berechnet aus den Quotienten der Substratpaare, werden in der Anoxie um fast den gleichen Betrag negativiert. Der Anstieg der Wasserstoffdrucke muß folglich in gleicher Größenordnung liegen. Die Potentialdifferenz von 30 bis 40 mVolt, die im stationären Zustand zwischen den beiden zellulären Räumen besteht, bleibt erhalten. Auch in der Anoxie kommt es zu keinem Ausgleich.

In Anoxie-Experimenten mit Zusatz von Pyruvat (67) konnte gezeigt werden, daß der angestaute Wasserstoff sich aus den einzelnen Räumen isoliert abziehen läßt. Die dadurch erzielten Veränderungen des Fluoreszenzverlaufes erlauben, die einzelnen Abschnitte der Fluoreszenzkurve bestimmten Redoxsystemen

---

+) LARDY (43) definiert das "Cytosol" als die Zellfraktion, die nach einstündiger Zentrifugation eines Gewebehomogenates bei 105000 g im löslichen Überstand gefunden wird. Es entspricht dem Cytoplasma minus Mitochondrien und den Komponenten des endoplasmatischen Retikulums.

zuzuordnen. Nach diesen Untersuchungen entspricht der schnelle Anstieg der Fluoreszenzintensität und des DPNH-Gehaltes beim Übergang zur Anaerobiose einem Wasserstoffanstau vorwiegend im mitochondrialen Raum. Der darauf folgende langsame Anstieg beider Parameter bei länger dauernder Anoxie ist ausschließlich extramitochondrial bedingt.

Diese unterschiedliche Beteiligung der Redoxsysteme während verschiedener Phasen des Anoxie-Zyklus, die nach der Aufschlüsselung der Fluoreszenzkinetik zu erwarten ist, kann jedoch mit den Analysen der Substratpaare im Perfusat nicht erfaßt werden. Die Redoxquotienten beider Systeme steigen in annähernd gleicher Weise an. Der daraus berechnete Potentialzuwachs zeigt keine entscheidenden zeitlichen Unterschiede zwischen den Reaktionen im intra- und extramitochondrialen Raum. Lediglich der extrapolierte Ordinatenabschnitt im Korrelationsdiagramm für den Potentialzuwachs (Abb. 20) weist auf eine stärkere mitochondriale Beteiligung zu Beginn der Anoxie hin. Möglicherweise reagieren die Redoxindikatoren zu träge, um schnelle, zeitlich begrenzte Vorgänge zu erfassen. Der Vergleich mit der Fluoreszenzkinetik läßt deshalb vermuten, daß intra- und extramitochondrialer Potentialzuwachs nur scheinbar korreliert sind.

4 .2. Zusammenbruch der Energetik

Im Gegensatz zur Muskelzelle, die im Kreatinphosphat eine relativ große Energiereserve besitzt, verfügt die Leberzelle nur über einen geringen Gehalt energiereicher Phosphate. Sie ist deshalb auf eine ununterbrochene oxydative Phosphorylierung angewiesen. Untersuchungen an der hämoglobinfrei perfundierten Leber (68) geben Hinweise, daß im stationären aeroben Zustand die Mitochondrien durch das Phosphatpotential kontrolliert werden. Zwischen ATP-Verbrauch und ATP-Bildung muß sich folglich ein Gleichgewicht einstellen, sodaß aus der Atmungsgröße auf den ATP-Umsatz der Leber geschlossen werden kann.

In den vorliegenden Experimenten wird in der zweiten Stunde der normoxischen Durchströmung ein mittlerer Sauerstoffverbrauch von 210 µg Atom pro Gramm Leber gemessen. Der Anteil des

Sauerstoffs, der nicht in der Atmungskette umgesetzt wird, ist für diese Experimente nicht bekannt. Er entspricht der cyanidresistenten Atmung, für die bei KCN-Vergiftung der hämoglobinfrei perfundierten Leber ein Anteil von 13% des gesamten Sauerstoffverbrauches gefunden wurde (70). Unter der Vorraussetzung einer maximalen Phosphorylierung von 3 Mol ADP pro Atom Sauerstoff läßt sich aus der korrigierten Atmungsgröße (210 - 27 = 183 /ug Atom Sauerstoff) eine mitochondriale ATP-Bildung von ungefähr 550 /uMol pro Stunde und Gramm berechnen. Dieser Wert repräsentiert in erster Näherung den Energieverbrauch der perfundierten Leber.

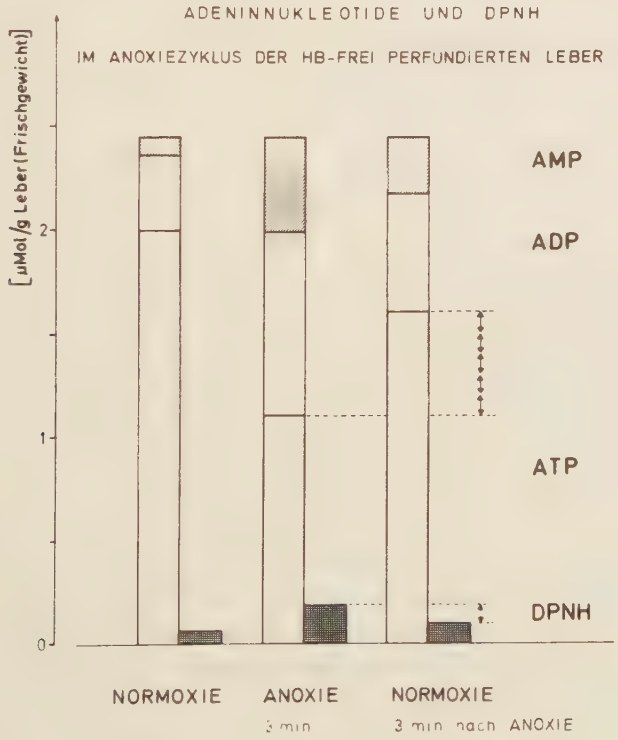

Abbildung 24 Adeninnukleotide und DPNH (Gewebsgehalte) im Anoxie-Zyklus der hämoglobinfrei perfundierten Leber. (Versuchsserie: siehe Abb. 12 und 13).

In der Normoxie beträgt der ATP-Gehalt ungefähr 2,5 µMol pro Gramm Gewebe; der Quotient ATP/ADP, der das Phosphatpotential wiederspiegelt, liegt bei Werten um 5. Eine Verminderung des Gewebsgehaltes auf 1,5 µMol ATP läßt den Quotienten ATP/ADP auf Werte um 1 absinken, bei denen wahrscheinlich keine energieverbrauchenden Prozesse mehr stattfinden können. Bei einem ATP-Verbrauch von ungefähr 550 µMol pro Stunde bedeuten 1 µMol ATP eine Energiereserve von 6-7 sec. Beim Übergang zur Anaerobiose, d.h. bei einem plötzlichen Ausfall der oxydativen Phosphorylierung, muß deshalb das Phosphatpotential innerhalb weniger Sekunden zusammenbrechen. Tatsächlich fällt innerhalb von 20 sec der Quotient ATP/ADP auf niedrige Werte ab, die sich bei länger dauernder Anoxie nur noch geringfügig verändern. Man muß jedoch berücksichtigen, daß die energieverbrauchenden Prozesse sich bei absinkendem Phosphatpotential zunehmend verlangsamen und daß der ATP-Verbrauch, für dessen Berechnung ein theoretischer P:O-Quotient von 3 zugrunde gelegt wurde, sicherlich zu hoch angesetzt ist. Außerdem werden mit den Metabolitanalysen unterschiedlich durchströmte Gewebsbezirke erfaßt, in denen die Anoxie nicht gleichzeitig einsetzt. Die tatsächliche Geschwindigkeit, mit der das Phosphatpotential in den einzelnen Leberzellen zusammenbricht, wird folglich durch die Gewebsanalyse nicht exakt wiedergegeben. Der gefundene Zeitraum von 20 sec, in dem das System der energiereichen Phosphate im Lebergewebe zerfällt, steht deshalb nicht im Gegensatz zu den obigen Überlegungen, nach denen die Leberzelle über eine Energiereserve für die Dauer von 6-7 sec verfügen muß.

Parallel zum System der Adenosinphosphate laufen die Veränderungen der Cytidin- und Guanosin-Phosphate. Der Zusammenbruch des Phosphatpotentials im Cytidin-System, repräsentiert durch den Quotienten CTP/CDP, ist jedoch um ungefähr eine Größenordnung stärker als im System der Adenosin-Phosphate. CDP wird nicht direkt in der Atmungskette, sondern durch eine Phosphatübertragung vom ATP phosphoryliert. Unter der Vorraussetzung, daß die freie Energie beider Systeme annähernd gleich ist, müßte der Quotient CTP/CDP als Indikator des tatsächlichen zellulären Phosphatpotentials herangezogen werden- vergleichbar der "indirekten" Potentialmessung der Redoxsysteme. Eingehende Untersuchungen zu diesem Problem stehen jedoch noch aus.

Dem raschen Zerfall der energiereichen Phosphate steht ein nur sehr langsamer Aufbau nach erneuter Sauerstoffzufuhr gegenüber. Der Ausgangswert ist nach 3 min noch nicht erreicht. Analysen zu einem späteren Zeitpunkt zeigen jedoch eine vollständige Rückbildung der Quotienten Tri- zu Diphosphate. In dieser Hinsicht ist eine kurzdauernde Anoxie der hämoglobinfrei perfundierten Leber reversibel. Die Gewebsgehalte bleiben jedoch erniedrigt, sodaß ein verstärkter Nukleotidabbau während der Anaerobiose angenommen werden muß, der anschließend nicht durch eine vermehrte Synthese kompensiert wird. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen am Herzmuskel, dessen Gehalt an Adenosinphosphaten noch mehrere Stunden nach einem kurzdauernden Herzstillstand erniedrigt ist (22, 36, 34), und an der Leber, wo im Gewebe nur eine langsame Restitution der Adenosinphosphate während der Wiederdurchblutung nach ischämischer Belastung gefunden wird (6, 17). Für einen gesteigerten Purinkatabolismus spricht auch die Ausschüttung von Harnsäure während der Anoxie, die weitgehend dem Verlust an Adenosin- und Guanosin-Phosphaten entspricht.

In den Bewegungen des Gewebsgehaltes der Adenosinphosphate ist das Z usammenspiel in diesem System angedeutet. Zusammen mit dem Absinken des Phosphatpotentials wird in der Adenylatkinasereaktion das energiereiche Phosphat im ADP verfügbar gemacht, wobei AMP entsteht. Infolge der hohen Gewebsaktivität der Adenylatkinase ist die Reaktion bereits im stationären aeroben Zustand dem Gleichgewicht angenähert. Der Adenylatkinasequotient, der normalerweise zwischen 1 und 2 liegt, verändert sich in der Anoxie weiter in Richtung der Gleichgewichtskonstanten, die mit 0,44 angegeben wird (18). Während ADP sofort nach Sauerstoffzufuhr, d.h. nach Wiedereinsetzen des Elektronenflusses in der Atmungskette, phosphoryliert wird, benötigt die Adenylatkinasereaktion einen gewissen Spiegel an ATP. Der erhöhte AMP-Gehalt kann deshalb nur mit Verzögerung absinken. In dem Augenblick, in dem diese Reaktion einsetzt, werden für ein Mol AMP, das verschwindet, zwei Mole ADP gebildet, sodaß die ADP-Rückbildung vorrübergehend stagniert, wie in den Metabolitanalysen zu erkennen ist.

Der verzögerte Aufbau des Phosphatpotentials erklärt die Atmungssteigerung in der Erholungsphase nach einer Anoxie. Im stationären Zustand der hämoglobinfrei perfundierten Leber ist die Atmung wahrscheinlich durch ADP kontrolliert (68). Die Mitochondrien in der intakten Leberzelle sind denen in einer Suspension vergleichbar, deren ADP-Angebot bei ausreichendem Substrat und Sauerstoff limitiert ist ("state 4" oder kontrollierter Z ustand (8, 9)). In der Erholungsphase ist dagegen ADP im Überschuß vorhanden, so daß der Elektronenfluß beschleunigt ist und jetzt nur durch die Kapazität der Atmungskette limitiert ist ("state 3" oder unkontrollierter Zustand). Mit zunehmenden Aufbau des ursprünglichen Phosphatpotentials durchlaufen die Mitochondrien die Übergangszustände zwischen "state 3" und "state 4" bis sie in Nähe von "state 4" ihren Ausgangszustand erreicht haben. In drei Minuten Erholungsphase werden ungefähr 2 µg Atom Sauerstoff zusätzlich verbraucht, wobei der DPNH-Gehalt um weniger als 0,1 µMol absinkt (Abb. 24). Dieser Vergleich weist auf eine hohe Umsatzrate des DPNH-pools hin. Die Menge des angestauten Wasserstoffs ist nicht an die Pyridinnukleotide gebunden, sondern vorwiegend in den reduzierten Substraten enthalten. Ein Sauerstoffverbrauch von 2 µg Atom entspricht bei einer maximalen Kopplung der oxydativen Phosphorylierung einer ATP-Produktion von 6 µMol. Der tatsächliche Zuwachs des ATP-Spiegels beträgt jedoch weniger als 10% des erwarteten Betrages. Als Erklärung für diese Diskrepanz muß einmal ein vermehrter Energieverbrauch in der Erholungsphase ("Sauerstoffschuld") diskutiert werden, zum anderen besteht die Möglichkeit einer geringeren Phosphorylierungsrate der Mitochondrien bei Übergang von "state 3" nach "state 4".

Die Gewebsentnahmen für Metabolitanalysen, sowie die Registrierung der Cytochromspektren (45) und der Sauerstoffdrucke an der Leberoberfläche (37) wurden jeweils unter Kontrolle der Fluoreszenzregistrierung durchgeführt. Mit Hilfe dieser gemeinsamen Meßgröße lassen sich die verschiedenen Parameter aufeinanderbeziehen. Ein markanter Punkt im Anoxie-Zyklus ist der Beginn des steilen Fluoreszenzanstieges, der ungefähr 20 sec nach Eintreffen von sauerstofffreier Perfusionslösung in der Vena portae einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Sauerstoff-

druck oberflächennaher Gewebsbezirke auf Werte unter 10 torr abgesunken, die Cytochrome c und a sind bereits zu mehr als 50% reduziert,und der Gewebsgehalt des reduzierten Diphosphopyridinnukleotids steigt plötzlich stark an. Die Veränderungen im System der energiereichen Phosphate beginnen dagegen noch vor diesem Zeitpunkt. Die Interpretation ist natürlich durch die Tatsache erschwert, daß sowohl bei Metabolitanalysen, als auch bei der Registrierung der Fluoreszenzintensität und der spektralen Veränderungen kein einheitlicher Gewebsbezirk untersucht wird. Alle Methoden integrieren die Veränderungen in einer größeren Zahl von Leberzellen, die dem Wechsel in der Sauerstoffversorgung nicht gleichzeitig unterworfen sind. In Abhängigkeit von den Durchströmungsverhältnissen sind Differenzen bis zu einer Dauer von 5 Sekunden zu erwarten. Der Ablauf der zellulären Vorgänge wird dadurch etwas verwischt. Trotz dieser Einschränkungen läßt sich aber aussagen, daß beim Übergang zur Anaerobiose die Reduktion der Cytochrome und der Zusammenbruch der Energetik die ersten meßbaren Veränderungen sind. Die gegebenen experimentellen Bedingungen erlauben jedoch nicht, ihre zeitliche Aufeinanderfolge zu analysieren. Der Anstau des Wasserstoffs setzt dagegen erst später ein. Dieser Befund ist im Hinblick auf den extramitochondrialen Wasserstoff verständlich, da die Prozesse, die im Cytosol vermehrt Wasserstoff freisetzen, erst durch die Veränderungen im System der energiereichen Phosphate ausgelöst werden (siehe unten). Andererseits ist das intramitochondriale DPNH im Fließgleichgewicht den Cytochromen nachgeordnet, sodaß ein Wasserstoffanstau erst dann zum Tragen kommt, wenn die oberen Glieder dieser Kette stärker mit Elektronen beladen sind. Bemerkenswert ist jedoch, daß offensichtlich das System der energetischen Transformation bereits bei einer geringfügigen Verlangsamung im Elektronenfluß beeinträchtigt wird.

4 .3. Anaerobe Glykolyse und Glykogenolyse

Sauerstoffentzug führt zu einer Steigerung des Kohlenhydratkatabolismus, die an der vermehrten Ausschüttung von Glykolyseendprodukten und Glukose zu erkennen ist. Der Umsatz in der Glykolysekette ist auf das 30-40-fache erhöht, wenn man die Abgabe von Lactat und Pyruvat an das Perfusat im aeroben und anaeroben Zustand vergleicht. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen kommt nur Glykogen als Substrat der Glykolyse in Frage. Glykogen wird in der Anoxie jedoch überschießend abgebaut, so daß ebenfalls Glukose freigesetzt wird. Ausgehend von der Ausschüttung an Glukose, Lactat und Pyruvat ist der Glykogenabbau ungefähr auf das 4-fache gesteigert. Nach erneuter Sauerstoffzufuhr geht die Geschwindigkeit beider Prozesse - Glykolyse und Glykogenolyse - in wenigen Minuten auf den Ausgangswert zurück. Sie sind deshalb nicht Folge einer irreversiblen Schädigung der Leberzellen, sondern Ausdruck einer Koordination im Intermediärstoffwechsel. Es erhebt sich die Frage nach dem koordinierenden Prinzip.

Der Kohlenhydratkatabolismus auf dem Wege von Poly- bzw. Monosacchariden zum Pyruvat ist nicht unmittelbar mit Sauerstoffakzeptoren verbunden. Eine Stimulierung von Glykolyse und Glykogenolyse in der Anaerobiose kann deshalb nur durch die direkten Folgen des Sauerstoffentzuges ausgelöst werden. In Frage kommen Wasserstoffanstau und Zusammenbruch der Energetik. Der Wasserstoffanstau wird zwar als Ursache der anaeroben Glykogenolyse diskutiert (49); jedoch scheint diese Möglichkeit zumindestens für die Leber unwahrscheinlich zu sein. Bei Prozessen, die mit einer vermehrten Wasserstofffreisetzung einhergehen -z.B. Äthanolabbau (23,24,69) - wird keine vergleichbare Stimulierung der Glykogenolyse beobachtet.

Gesichert sind dagegen die Auswirkungen der Adenosinphosphate auf den Kohlenhydratkatabolismus. Unmittelbar nach Aussetzen der oxydativen Phosphorylierung häufen sich die energieärmeren Phosphate - AMP und ADP - sowie das anorganische Phosphat an, während ATP verschwindet. Nach LYNEN (46) sind die zellulären Konzentrationen an anorganischem Phosphat und des Phosphatakzeptors ADP entscheidend für die Geschwindigkeit der

oxydierenden Gärungsreaktion (Reaktion der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase), durch die der Weg vom Triosephosphat zum Pyruvat eingeleitet wird. Da die Konzentrationen des anorganischen Phosphates und des ADP vom Umsatz der oxydativen Phosphorylierung in der Atmungskette abhängen, ist über diese Reaktion eine Steuerung der Glykolyse durch die Atmung im Sinne des "Pasteur"-Effektes möglich.

Ein weiterer Angriffspunkt ist die Reaktion der Phosphofrukto-Kinase, die nach den frühen Untersuchungen CORI's (16) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Glykolyse spielen soll. Nach AISENBERG und POTTER (1) und LYNEN et al. (47) soll diese Reaktion der limitierende Schritt im Embden-Meyerhof-Weg sein. Die Phosphofruktokinase Reaktion unterliegt vielfältiger Kontrolle durch Metabolite und Produkte des zellulären Metabolismus. LARDY und PARKS berichteten erstmals von einer Hemmung des Enzyms aus Skelettmuskel durch ATP (44), PASSONEAU und LOWRY von einer Aktivierung durch AMP (55). Diese Effekte wurden durch UNDERWOOD und NEWSHOLME ebenfalls an der Phosphofrukto-Kinase aus Leber nachgewiesen (75). Insgesamt wurden als Aktivatoren der Phosphofrukto-Kinase gefunden: Fruktose-1,6-diphosphat(55), Glukose-1,6-diphosphat (58), 3'5'-AMP (48), 5'-AMP (55), Fruktose-6-phosphat (55,58), ADP (55), anorganisches Phosphat (55), Ammonium- (56,52), Wasserstoff- (58) und Magnesium-Ionen (29), wobei die verschiedenen Substanzen hier in der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit aufgezählt werden (29).

Die Phosphofrukto-Kinase erscheint deshalb als ein Schlüsselenzym, das verschiedenen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Unter aeroben Bedingungen wird seine Aktivität durch einen hohen ATP-Spiegel gebremst. In der Anoxie fällt diese Hemmung jedoch weg. Zusätzlich erfolgt eine Aktivierung durch AMP, anorganisches Phosphat, Ammonium und Fruktose-1,6-diphosphat, deren zelluläre Konzentrationen in der Anoxie ansteigen. Der Gewebsgehalt an AMP in der perfundierten Leber nimmt in der Anoxie von 110 auf 460 nanoMol/g FG zu. Natürlich gibt dieser Meßwert keinen Anhalt für die tatsächlichen AMP-Konzentrationen am Wirkungsort der Phosphofrukto-Kinase-Reaktion. Allein unter Berücksichtigung des extrazellulären Raumes muß ein Faktor von ungefähr

zwei für die zellulären Gehalte angenommen werden. Diese Steigerung des AMP-Gehaltes läßt aber vermuten, daß auf jeden Fall Konzentrationen für eine wirksame Aktivierung der Phosphofrukto-Kinase erreicht werden. Außer AMP und ADP wurden keine weiteren Aktivatoren der Phosphofrukto-Kinase im Lebergewebe bestimmt. Für Ammonium liegen nur Konzentrationen im Perfusat vor, bei denen ein Anstieg von 0,05 auf 0,15 mM beobachtet wird. Diese Konzentrationen liegen weit unterhalb des Bereiches einer wirksamen Phosphofrukto-Kinase-Aktivierung durch Ammonium-Ionen; jedoch ist es nicht ausgeschlossen, daß die zellulären Konzentrationen bedeutend höher liegen.

Eine offene Frage ist die Stimulierung der Glykogenolyse in der Anoxie. Eine Aktivierung durch AMP ist nur bei der Muskelphosphorylase bekannt. Die Leberphosphorylase soll dagegen ausschließlich durch Phosphorylierung mit ATP aktiviert werden. ATP fehlt aber in der Anoxie. Möglicherweise besteht dennoch der Mechanismus einer Aktivierung durch energieärmere Phosphate, den SUTHERLAND (72) bereits 1955 erwogen hat. Allerdings könnte die Glykogenolyse auch durch den hohen Durchsatz in der Glykolysekette beeinflußt werden, durch den Glukose-6-phosphat und dadurch auch Glukose-1-phosphat ständig abgezogen werden, so daß die Reaktion der Phosphorylase stark in Richtung Glykogenabbau gelenkt wird.

6. Zusammenfassung

Die Stoffwechselwirkungen von Sauerstoffentzug und Restitution auf die hämoglobinfrei perfundierte Rattenleber wurden mit Hilfe amperometrischer Sauerstoffbestimmung, Fluorometrie, Metabolitanalysen im Perfusat und im Gewebe untersucht.

1. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei Übergang auf anaerobe Verhältnisse in charakteristischer Form zu. Verschiedene Phasen können unterschieden werden: 1. Latenzphase, 2. schneller Anstieg bei 20 sec und 3. langsamer Anstieg ab 30 sec. In der Erholungsphase sinkt die Fluoreszenzintensität wieder ab, wobei ungefähr 70% des Anstieges in der Anoxie sich innerhalb einer Minute zurückbilden.

2. In Übereinstimmung mit der Fluoreszenzkinetik steigt der DPNH-Gehalt des Gewebes in der Anoxie an und fällt nach Sauerstoffzufuhr wieder ab. Der Gewebsgehalt nimmt in drei Minuten Anaerobiose von 65 auf 189 nanoMol/g FG zu.

3. Der TPNH-Gehalt (216 nanoMol/g FG in der Normoxie) steigt bei Anoxie noch vor dem DPNH-Gehalt rasch an und erreicht nach ungefähr einer Minute ein Maximum (324 nanoMol/g FG). Bei länger dauernder Anoxie ist im Unterschied zum DPN-System eine Tendenz zur Oxydation des TPNH zu sehen, die in der Erholungsphase nicht verstärkt ist.

4. Nach 15 min sauerstofffreier Durchströmung wird das extramitochondriale Redoxpotential, errechnet aus den Quotienten der Konzentrationen Lactat/Pyruvat im Perfusat, von -226 auf -254 mVolt negativiert. In demselben Zeitraum wird das mitochondriale Redoxpotential, berechnet aus den Konzentrationen ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat, von -267 auf -289 mVolt negativiert.

5. In der Anoxie sind beide Systeme in fast gleicher Weise an den Redoxveränderungen beteiligt. In der Erholungsphase scheint sich das ß-HOB-AcAc-System verzögert zurückzubilden.

6. Die Gewebsgehalte der energiereichen Triphosphate nehmen beim Übergang zur Anaerobiose ab und die der Mono- und

Diphosphate zu. Das Potential der energiereichen Phosphate, das durch die Quotienten ATP/ADP, GTP/GDP und CTP/CDP wiedergegeben wird, bricht nach einer Latenzphase von 10 sec zusammen. Die Veränderungen im System der Cytidinphosphate sind um eine Größenordnung stärker als im System der Adenosinphosphate.

7. Die Summe der Adenosinphosphate nimmt während der Anoxie und in der anschließenden Erholungsphase ab. Harnsäure wird in vergleichbaren Zeiträumen vermehrt gebildet und in das Perfusat ausgeschüttet. Der Purinkatabolismus scheint in der Anaerobiose um 2 Größenordnungen gesteigert zu sein.

8. Die Veränderungen im System der energiereichen Phosphate bilden sich nach Sauerstoffzufuhr nur langsam zurück. Das ursprüngliche Phosphatpotential ist nach 3 min Erholungsphase noch nicht wieder aufgebaut. Ein Anstieg im ATP-Gehalt und ein Abfall im ADP-Gehalt ist allerdings wenige Sekunden nach Sauerstoffzufuhr zu erkennen. Die Rückbildung des letzteren stagniert, wenn nach einer Verzögerungsphase AMP verschwindet, für dessen Phosphorylierung ATP benötigt wird.

9. In der Erholungsphase nach einer Anoxie ist die Atmung um 10% gesteigert. Der vermehrte Sauerstoffverbrauch beträgt in den ersten 15 min Erholungsphase ungefähr 3-4 /ug Atom Sauerstoff.

10. Nach Sauerstoffentzug steigt die Ausschüttung von Lactat und Pyruvat von ungefähr 5 auf 160 /uMol pro Stunde und Gramm Leber an. Gleichzeitig wird die Glukoseausschüttung verdoppelt. Diese Steigerung des Kohlenhydratabbaus bildet sich in der Erholungsphase sofort zurück. Die Aktivierung der anaeroben Glykolyse und Glykogenolyse durch die Anhäufung energieärmerer Phosphate wird diskutiert.

11. Der Proteinkatabolismus scheint unter anaeroben Verhältnissen unverändert zu sein. Die Harnstoffsynthese ist jedoch unterbunden; sie setzt nach Sauerstoffzufuhr wieder ein.

Anhang

Tabelle 1. Spezifische Extinktionskoeffizienten von Nukleotiden.

	ε_{265nm} ($cm^2/\mu Mol$)	ε_{280nm} ($cm^2/\mu Mol$)	$\frac{E_{280}}{E_{265}}$	aufgenommen bei pH
DPN	17,61	4,55	0,26	2
TPN	17,31	4,27	0,25	2
AMP	13,79	3,35	0,25	2
HS	4,16	9,52	2,33	2+)
CDP	8,29	12,70	1,53	2
DPNH	13,81	3,64	0,26	7,5
UMP	9,78	3,94	0,40	7
UDPAG	9,96	4,22	0,42	2++)
UDPG	9,94	4,35	0,44	2++)
IMP	5,29	1,77	0,34	3-7
ADP	13,31	3,31	0,25	2
TPNH	13,61	3,43	0,25	7,5
CTP	8,35	13,15	1,57	2
ATP	13,21	3,40	0,26	2
GDP	10,21	8,15	0,79	1
UTP	10,01	3,85	0,39	7
GTP	10,26	8,07	0,78	1

+) Harnsäure, nach Daten von SCHLENK (62).
++) UDP-Derivate, nach eigenen Untersuchungen berechnet.
Alle anderen Daten sind aus einer Zusammenstellung der PABST-Laboratories (53) entnommen.

Tabelle 2.

Freie Nukleotide im Lebergewebe (nano Mol/ g Leber (Frischgewicht))

Abhängigkeit von der Schichttiefe (µm) bei der Frierstopmethode.

Exp.	Tiefe	DPN	DPNH	TPN	TPNH	AMP	ADP	ATP	ATP/ADP	UMP	UTP	CDP	CTP	CTP/CDP	GDP	GTP	GTP/GDP
27/1	40- 240	502	76	60	267	121	557	2346	4,2	48	-	3	66	22	54	252	4,7
2	240- 440	430	80	46	254	143	590	2320	3,9	67	240	3	61	20	52	292	5,6
3	440- 640	512	84	47	270	159	570	2300	4,1	54	196	3	65	20	50	292	5,8
4	640- 840	546	86	61	325	143	586	2554	4,3	54	286	4	76	19	60	282	4,7
5	840-1040	490	78	50	254	120	595	2407	4,1	75	158	4	63	16	57	257	4,5
6	1040-1240	486	78	56	274	127	545	2220	4,1	96	170	3	62	20	57	290	5,7
38/4	700- 900	502	89	58	178	139	535	2067	3,9	152	178	5	55	11	58	264	4,6
5	900-1100	513	95	65	173	149	585	2170	3,7	-	183	6	60	10	69	279	4,0
7	1300-1500	490	90	70	126	136	590	1845	3,1	-	136	8	51	6	73	168	2,3
8	1700-1900	457	87	46	160	147	600	1638	2,7	177	140	10	53	5	79	160	2,0

Tabelle 3. Pyridinnukleotidgehalt des Lebergewebes im Anoxie-Zyklus (nanoMol/g FG^+ Leber)

		DPNH	$\frac{DPNH}{\Sigma D} \cdot 100$	TPN	TPNH	$\frac{TPNH}{\Sigma T} \cdot 100$
N^+	0 sec	65 ± 4	9	70 ± 11	216 ± 11	76
A	8 sec	78 ± 13	11	56 ± 7	285 ± 53	84
A	18 sec	88 ± 10	12	77 ± 19	299 ± 42	80
A	30 sec	142 ± 18	19	42 ± 4	308 ± 25	88
A	55 sec	154 ± 13	21	42 ± 4	324 ± 23	89
A	180 sec	189 ± 18	26	56 ± 14	303 ± 25	85
N	15 sec	138 ± 23	19	39 ± 7	287 ± 26	88
N	30 sec	121 ± 8	17	40 ± 4	300 ± 35	88
N	60 sec	108 ± 4	15	39 ± 4	301 ± 26	88
N	180 sec	100 ± 7	14	44 ± 9	275 ± 12	86
N	40 min	61	8	58	199	78

N = Normoxie, A = Anoxie

M ± S.E.M.

N^+ = Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen

FG^+ = Feuchtgewicht der Leber, bezogen auf das Gewicht vor der Perfusion, d.i.: Gramm perf. Leber •1,75(Schwellungsfaktor)

Reduktionsgrad: $\frac{DPNH}{\Sigma D} \cdot 100$, bzw. $\frac{TPNH}{\Sigma T} \cdot 100$

D = 730 nanoMol/g, nach enzymatischer Analyse von sauren und alkalischen Gewebsextrakten von Rattenlebern in vivo.

Tabelle 4. Gewebsgehalt der energiereichen Phosphate im Anoxie-Zyklus (nanoMol/g Leber FG^+)

	AMP	ADP	ATP	CDP	CTP	GDP	GTP	UMP	UTP
N^+ 0 sec	107 ±21	382 ±33	2100 ±179	1$^+$)	74 ± 5	60 ± 5	214 ±25	35 ± 9	229 ±18
A 8 sec	142 ±35	441 ±72	2280 ±135	3	88 ±12	68 ±12	234 ±35	53 ±19	288 ±46
A 18 sec	189 ±42	585 ±70	2160 ±382	5 ±1	88 ±18	74 ±12	224 ±40	61 ±16	257 ±58
A 30 sec	318 ±58	820 ±23	1700 ±138	11 ±1	68 ± 9	95 ±12	240 ±39	81 ±19	256 ±37
A 55 sec	354 ±37	837 ±82	1510 ±310	18 ±5	44 ± 7	103 ±11	206 ±32	103 ±21	154 ±28
A 180 sec	459 ±53	883 ±81	1100 ±175	12 ±2	30 ± 9	109 ±14	144 ±18	177 ±19	126 ±19
N 15 sec	380 ±53	636 ±53	1120 ±108	10 ±2	33 ± 4	126 ± 9	186 ±19	96 ±21	226 ±63
N 30 sec	280 ±47	744 ±121	1310 ±257	15 ±2	40 ± 7	100 ±14	210 ±32	79 ±16	203 ±51
N 60 sec	266 ±39	550 ±119	1380 ±115	12 ±4	42 ± 4	86 ±12	240 ±28	53 ±11	222 ±36
N 180 sec	264 ±33	540 ±93	1500 ± 95	8 ±2	47 ± 2	70 ± 9	189 ±25	56 ±16	276 ±27
N 40 min	129	298	1720	3	86	54	168	23	145

N = Normoxie, A = Anoxie

M ± S.E.M.

N^+ = Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen

FG^+ = Feuchtgewicht der Leber, bezogen auf das Gewicht vor der Perfusion,
d.i.: Gramm perfundierte Leber x 1,75 (Schwellungsfaktor)

$^+$) CDP an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze der chromatographischen Analyse.

Tabelle 5. Adenosinphosphate (Summe AMP+ADP+ATP = 100) des Lebergewebes im Anoxie-Zyklus

		AMP	ADP	ATP
N^+	0 sec (n=11)	4,5 ± 1,0	14,7 ± 0,8	80,8 ± 1,2
A	8 sec (4)	5,0 ± 1,2	15,0 ± 1,7	80,0 ± 1,8
A	18 sec (5)	7,0 ± 2,2	20,4 ± 2,2	72,5 ± 4,1
A	30 sec (5)	11,2 ± 1,7	30,0 ± 2,3	59,4 ± 3,8
A	55 sec (7)	15,6 ± 1,8	30,9 ± 1,4	54,6 ± 3,0
A	180 sec (5)	19,6 ± 3,1	36,1 ± 1,8	44,4 ± 4,0
N	15 sec (5)	17,8 ± 1,8	30,0 ± 1,8	52,2 ± 1,0
N	30 sec (4)	12,0 ± 1,1	32,0 ± 4,0	56,1 ± 4,1
N	60 sec (6)	12,1 ± 1,0	23,9 ± 3,1	64,0 ± 4,3
N	180 sec (4)	11,5 ± 1,5	23,1 ± 2,7	65,3 ± 3,7
N	40 min (1)	6,0	14,0	80,0

N = Normoxie, A = Anoxie

M ± S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese

N^+ = Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen

Tabelle 6. Phosphatpotential und Adenylatkinasequotient im Anoxie-Zyklus

		$\frac{ATP}{ADP}$	$\frac{CTP}{CDP}$	$\frac{GTP}{GDP}$	$\frac{AMP \times ATP}{ADP^2}$
N^+	0 sec	5,7 ± 0,4	30+)	3,8 ± 0,5	2,0 ± 0,9
A	8 sec	5,7 ± 0,1	25+)	3,4 ± 0,4	2,5 ± 1,4
A	18 sec	3,7 ± 0,5	10,2 ± 3,6	3,0 ± 0,5	1,1 ± 0,2
A	30 sec	2,1 ± 0,3	6,0 ± 0,7	2,5 ± 0,3	0,8 ± 0,3
A	55 sec	1,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1	1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2
A	180 sec	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,7	1,3 ± 0,2	0,7 ± 0,1
N	15 sec	1,8 ± 0,1	3,5 ± 0,6	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3
N	30 sec	1,9 ± 0,4	2,9 ± 0,6	2,4 ± 0,7	0,8 ± 0,2
N	60 sec	2,5 ± 0,8	6,6 ± 2,2	3,2 ± 0,6	1,9 ± 0,5
N	180 sec	3,1 ± 0,5	6,8 ± 1,4	2,9 ± 0,6	1,6 ± 0,3
N	40 min	5,7	35	3,1	2,5

N = Normoxie, A = Anoxie, M ± S.E.M.

N^+= Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen

+) = keine genaue Angabe möglich, da CDP in diesen Experimenten an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze der Methode liegt.

Tabelle 7. Purin-Derivate des Lebergewebes im Anoxie-Zyklus (nanoMol/g FG^+)

		AMP+ADP+ATP	GDP+GTP	Harnsäure
N^+	0 sec (n=11)	2580 ± 179	273 ± 25	1
A	8 sec (4)	2870 ± 191	287 ± 37	1
A	18 sec (5)	2960 ± 382	283 ± 35	2 ± 2
A	30 sec (5)	2880 ± 147	334 ± 47	13 ± 7,1
A	55 sec (7)	2760 ± 156	354 ± 42	18 ± 3,5
A	180 sec (5)	2450 ± 203	256 ± 31	25 ± 7,7
N	15 sec (5)	2160 ± 173	276 ± 26	16 ± 4,9
N	30 sec (4)	2360 ± 348	310 ± 28	18 ± 8,7
N	60 sec (6)	2200 ± 182	326 ± 28	8 ± 1,9
N	180 sec (4)	2300 ± 187	266 ± 21	6 ± 2,6
N	40 min (1)	2150	222	1

N = Normoxie, A = Anoxie
M ± S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese
N^+= Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen
FG^+= Feuchtgewicht der Leber, bezogen auf das Gewicht vor der Perfusion, d.i.: Gramm perfundierte Leber x 1,75 (Schwellungsfaktor).

Tabelle 8. Gewebsgehalt der Uridin-diphosphat-Derivate im Anoxie-Zyklus (nanoMol/g FG^+ Leber)

		UDPAG	UDPG
N^+	0 sec (n=11)	331 ± 16	273 ± 25
A	8 sec (4)	369 ± 16	238 ± 21
A	18 sec (5)	336 ± 20	238 ± 25
A	30 sec (5)	-	220 ± 25
A	55 sec (7)	364 ± 25	228 ± 44
A	180 sec (5)	367 ± 30	289 ± 63
N	15 sec (5)	245 ± 35	326 + 19
N	30 sec (4)	362 ± 43	322 ± 60
N	60 sec (6)	350 ± 22	301 ± 19
N	180 sec (4)	366 ± 11	308 ± 31

N = Normoxie, A = Anoxie,
M ± S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese
N^+= Leber nach 60 min Perfusion unter Standardbedingungen
FG^+= Feuchtgewicht der Leber, bezogen auf das Gewicht vor der Perfusion, d.i.: Gramm perfundierte Leber x 1,75 (Schwellungsfaktor).

Tabelle 9. Lactat- und Pyruvat-Konzentrationen im Perfusat (nanoMol/ml Perfusat)

min	90	105	120	122	125	130	135	137	140	145	150	180
	Normoxie			Anoxie				Normoxie				
Lactat												
A	2506	2550	2650	3320	4040	4700	5780	5540	5330	5220	5160	5020
	±423	±450	±500	±470	±533	±585	±635	±695	±670	±680	±690	±740
K	2520	2650	2740				2850				2950	2930
	±554	±657	±606				±718				±799	±770
Pyruvat												
A	433	460	487	350	272	196	156	275	463	602	655	643
	± 69	± 73	± 77	± 77	± 56	± 16	± 38	± 45	± 50	± 62	± 68	± 86
K	348	355	367				367				374	362
	± 34	± 44	± 46				± 50				± 57	± 56
Lactat / Pyruvat												
A	6,1	5,5	5,4	10,4	15,9	27,3	41,3	21,9	11,5	8,6	7,9	7,9
	±0,4	±0,5	±0,4	±1,0	±1,3	±3,3	±5,5	±2,8	±0,8	±0,6	±0,5	±0,6
K	6,9	7,0	7,1				7,4				7,5	7,7
	±1,1	±1,1	±1,1				±1,1				±1,4	±1,4

K = Kontrollversuche, n = 5, M ± S.E.M.
A = Anoxieversuche, n = 7,

Tabelle 10. ß-Hydroxybutyrat- und Acetoacetat- Konzentrationen im Perfusat (nanoMol/ml)

		min	90	105	120	122	125	130	135	137	140	145	150	180
			Normoxie			Anoxie				Normoxie				
ß-HOB	A		228 ±43	223 ±31	230 ±39	303 ±44	376 ±37	462 ±87	513 ±93	461 ±99	412 ±78	382 ±66	336 ±60	340 ±85
	K		211 ±30	242 ±52	259 ±45				274 ±63				304 ±119	376 ±98
AcAc	A		247 ±23	276 ±26	291 ±30	222 ±21	168 ±20	143 ±20	119 ±12	143 ±13	192 ± 8	222 ±18	242 ±23	284 ±30
	K		224 ±19	232 ±18	239 ±18				257 ±14				267 ±13	285 ±16
ß-HOB / AcAc	A		0,72 ±0,11	0,81 ±0,08	0,82 ±0,15	1,50 ±0,17	2,37 ±0,43	3,37 ±0,66	4,31 ±0,69	3,35 ±0,78	2,15 ±0,44	1,76 ±0,40	1,44 ±0,41	1,21 ±0,39
	K		0,95 ±0,12	1,03 ±0,14	1,06 ±0,17				1,06 ±0,21				1,10 ±0,23	1,04 ±0,33

A = Anoxieversuche, n = 7, M ± S.E.M.
K = Kontrollversuche, n = 5,

Tabelle 11. Austausch mit dem Perfusat
(/uMol/Std./g Leber FG)

min		60-90	90-120	120-135	135-150	150-180
		Normoxie		Anoxie	Normoxie	
	A	-0,3	3,8	176,0	-27,0	-10,0
Lactat		±2,2	±3,2	±7,0	±3,0	±6,0
	K	8,3	6,2	6,2	6,5	1,2
		±5,2	±4,1	±2,1	±6,0	±7,5
	A	3,3	1,3	-15,0	27,0	-1,6
Pyruvat		±1,6	±0,6	±2,0	±3,0	±0,8
	K	0,8	0,1	-0,2	-0,1	-0,3
		±0,5	±0,1	±0,2	±0,3	±0,2
	A	3,0	5,1	161,0	0,0	-12,0
Lact. Pyr.		±2,2	±3,7	±7,3	±6,1	±6,1
	K	9,1	6,2	6,0	4,0	0,9
		±5,5	±4,2	±2,0	±3,0	±2,3
	A	28	43	90	28	15
Glukose		±4	±6	±8	±4	±9
	K	29	27	17	18	9
		±4	±6	±4	±4	±4

K = Kontrollversuche, n = 5, M ± S.E.M.
A = Anoxieversuche, n = 7,

Tabelle 12. Glukosekonzentrationen im Perfusat (nanoMol/ml Perfusat)

min	90	105	120	122	125	130	135	137	140	145	150	180
	Normoxie			Anoxie				Normoxie				
A	5500	6130	6770	6450	7380	7730	8450	8450	8700	8850	8950	9300
	±476	±510	±514	±521	±551	±665	±727	±889	±768	±999	±695	±805
Glukose												
K	4310	4860	5280				5600				5940	6080
	±728	±880	±982				±1020				±1110	±1180

A = Anoxieversuche, n = 7, M ± S.E.M.
K = Kontrollversuche, n = 5,
Perfusat = 200 ml,
Gewicht der Lebern: A = 14,5 ± 1 g FG (Trockengewicht x 5)
K = 14,0 ± 1 g FG

Tabelle 13. Austausch mit dem Perfusat
(/uMol/Std./g FG Leber)

min		60-90	90-120	120-135	135-150	150-180
		Normoxie		Anoxie	Normoxie	
ß-Hydroxy-butyrat	A	0,9 ±0,2	-0,2 ±1,0	15,3 ±0,9	-9,6 ±0,5	0,7 ±0,7
	K	1,0 ±0,4	1,2 ±0,6	0,8 ±0,6	1,3 ±0,6	1,6 ±0,9
Acetoacetat	A	0,8 ±0,5	1,2 ±0,9	-11,1 ±1,4	7,3 ±2,1	1,7 ±0,4
	K	0,3 ±0,1	0,4 ±0,1	1,0 ±0,3	0,5 ±0,2	1,4 ±0,5
Ketokörper	A	1,7 ±0,5	1,0 ±0,3	4,3 ±1,2	-2,6 ±1,8	2,5 ±1,1
	K	1,2 ±0,3	1,7 ±0,6	2,0 ±0,4	1,8 ±0,4	2,9 ±0,8

K = Kontrollversuche, n = 5, M ± S.E.M.
A = Anoxieversuche, n = 7,

Tabelle 14. Harnstoff- und Ammoniak-Konzentrationen im Perfusat (nanoMol/ml)

min		90	105	120	122	125	130	135	137	140	145	150	180
		Normoxie			Anoxie				Normoxie				
Harnstoff	A	464	548	642	640	683	670	680	705	753	813	853	985
		±36	±37	±38	±41	±57	±63	±63	±86	±71	±85	±76	±88
	K	342	400	463				515				576	628
		±42	±49	±55				±65				±76	±88
Ammoniak	A	51	60	58	90	88	118	155	135	116	102	85	79
		±5	±11	±11	±11	± 5	± 7	±25	±15	±10	±13	± 9	± 7
	K	31	33	50				46				59	68
		±13	±12	±16				±17				±18	±13

A = Anoxieversuche, n = 7, M ± S.E.M.
K = Kontrollversuche, n = 5,

Tabelle 15. Austausch mit dem Perfusat
(/uMol/Std./g Leber FG)

min		60-90	90-120	120-135	135-150	150-180
		Normoxie		Anoxie	Normoxie	
Harnstoff	A	3,4 ±0,4	4,4 ±0,7	1,2 ±0,1	8,5 ±1,5	5,8 ±0,7
	K	2,5 ±0,5	3,5 ±0,7	3,1 ±0,5	2,1 ±0,6	3,3 ±0,6
Ammoniak	A	0,2 ±0,1	0,1 ±0,04	5,2 ±0,8	-3,5 ±0,8	0,4 ±0,4
	K	-0,2 ±0,2	0,5 ±0,2	0,0 ±0,3	0,3 ±0,1	0,2 ±0,3
Amino-Stickstoff+)	A	98	125	107	189	168
	K	67	105	87	63	95

A = Anoxieversuche, n = 7, M ± S.E.M.
K = Kontrollversuche n= 5,
+) = Aminostickstoff in /ug/Std./g Leber FG.

Verzeichnis der Abkürzungen

AcAc	Acetoacetat
ß-HOB	ß-Hydroxybutyrat
L (L/P)	Lactat
P (L/P)	Pyruvat
DPN	Diphosphopyridinnukleotid (NAD)
DPNH	" reduzierte Form (NADH)
TPN	Triphosphopyridinnukleotid (NADP)
TPNH	" reduzierte Form (NADPH)
ADPR	Adenosinphosphatribose
ADPRP	Adenosin-5'-diphosphat-Ribose-2'-phosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HS	Harnsäure
IMP	Inosin-5'-monophosphat
UDPG	Uridindiphosphatglukose
UDPAG	Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
GluDH	Glutamatdehydrogenase
ß-HOBDH	ß-Hydroxybutyratdehydrogenase
LDH	Lactatdehydrogenase
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
TRAP	Triäthanolamin-Puffer
FG	Frischgewicht
M	molar
mM	10^{-3} molar
M ± S.E.M.	Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes $\pm \sqrt{\frac{\Sigma(X - M)^2}{n \cdot (n-1)}}$

Literatur

1. AISENBERG, A.C., V.R. POTTER:
"Studies on the Pasteur-Effect. II Specific Mechanisms."
J. Biol. Chem. 224, 1115 (1957).

2. BIERMANN, P.: München, persönliche Mitteilung.

3. BRAUER, R.W., R.L. PESOTTI and P. PIZZOLATO:
"Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties."
Proc. Coc. exp. Biol. (N.Y.) 78, 174 (1951).

4. BÜCHER, TH., M. KLINGENBERG:
"Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation."
Angew. Chem. 75, 900 (1963).

5. BÜCHER, TH., K. KREJCI, W. RÜSSMANN, H. SCHNITGER and W. WESEMANN:
"Metabolite assay in frozen samples of liver tissue."
Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry.
Ed. B. Chance, New York: Acad. Pr. 1964. S. 255.

6. BUSCH, E.W., G. HABEL und P.v. WICHERT:
"Restitution von Adenosinphosphaten in Lebergewebe während der Wiederdurchblutung nach ischämischer Belastung bis zu 5 Std. Dauer."
Biochem. Z. 341, 85 (1964).

7. CHANCE, B. and JÖBSIS, F.:
"Changes in fluorescence in a frog sartorius muscle following a twitch."
Nature 184, 195 (1959).

8. CHANCE, B., G.R. WILLIAMS:
"The respiratory chain and oxidative phosphorylation. III. The steady state."
J. Biol. Chem. 217, 409 (1955).

9. CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS:
" The respiratory chain and oxydative phosphorylation."
Advances in Enzymology 17, 65 (1956).

10. CHANCE, B., J.R. WILLIAMSON, D. JAMIESON and B. SCHOENER:
"Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide of the isolated and in vivo rat heart."
Bioch. Z. 341, 357 (1965).

11. CHAYKIN, S., I.O. MEINARD and E.G. KREBS:
"Properties of DPNH-X."
J. Biol. Chem. 220, 811 (1956).

12. CLARK, L.C.:
"Monitoring and control of blood and tissue O_2 tensions."
Amer. Soc. Art. Int. Organe, 2, 41 (1956).

13. CLARK, L.C., R. WOLF, D. GRANGER and Z. TAYLOR:
"Continous recording of blood oxygen tensions by polarography."
J. appl. Physiol. 6, 189 (1953).

14. COHN, W.E.:
"The Anion-Exchange Separation of Ribonucleotides."
J. Am. Chem. Soc. 72, 147 (1950).

15. COREY, E.L. and S.W. BRITTON:
Amer. J. Physiol. 131, 783 (1941).

16. CORI, C.F.:
In: A symposium on respiratory enzymes, University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 1942, p. 175.

17. DEUTICKE, B., E. GERLACH, R. DIEKERMANN:
"Abbau freier Nukleotide in Herz, Skelettmuskel, Gehirn und Leber der Ratte bei Sauerstoffmangel."
Pflügers Archiv 292, 339 (1966).

18. EGGLESTON, L.V. und HEMS, R.:
"Separation of adenosin phosphate by paper chromatographie and the equilibrium constant of the myokinasesystem."
Biochem. J. 52, 156 (1952).

19. ESTABROOK, R.W.:
"Fluormetric measurement of reduced pyridine nucleotide in cellular and subcellular particles."
Analytical Biochem. 4, 231 (1962).

20. ESTABROOK, R.W. and MACHLER:
"Enzymatic and spectrophotometric studies of a reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase preparation from heart muscle."
J. Biol. Chem. 229, 109 (1957).

21. ESTABROOK, R.W. and NISSLEY, S.P.:
"Observations mitochondrial pyridine nucleotides during oxidative phosphorylation."
Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle.
Wiss. Konferenz Ges. Dt. Naturforscher u. Ärzte.
Rottach-Egern 1962, Berlin:Springer 1963 S.119.

22. FLECKENSTEIN, A.:
"Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myocards."
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 70, Kongreß 1964, S 82.

23. FORSANDER, O.A., P.H. MÄENPÄÄ, M.P. SALASPURO:
"Influence of ethanol on the lactate/pyruvate and ß-hydroxybutyrat/acetoacetat ratios in rat liver experiments."
Acta Chem Scand 19, 1770 (1965).

24. FORSANDER, O.A., RÄIHÄ, N., SALASPURO, M., MÄENPÄÄ, P.:
" Influence of ethanol on the liver metabolism of fed and starved rats"
Biochem. J. 94, 259 (1965).

25. GERCKEN, G.:
"Die quantitative enzymatische Dehydrierung von L(+)-Lactat für die Mikroanalyse."
Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chemie 320, 180 (1960).

26. GLEICHMANN, U. und D.W. LÜBBERS:
"Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut."
Pflügers Arch. Ges. Physiol 271, 431 (1960).

27. HELDT, H.W.:
"Über Phosphat-haltige Metabolite in Geweben und in isolierten Mitochondrien."
Diss., Phil. Fak., Univ. Marburg, 1962.

28. HELDT,H.W., N. GREIF, M. KLINGENBERG, R. SCHOLZ, U. PANTEN, J. GRUNST und TH. BÜCHER:
" On the problem of acid-labile triphosphopyridine nucleotide in biological material."
J. Biol. Chem. 240, 4659 (1965).

29. HOFER, H., D. PETTE: München, persönliche Mitteilung.

30. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ und TH. BÜCHER:
"Über Metabolitgehalte und Metabolit-Konzentrationen in der Leber der Ratte."
Biochem. Z. 82, 90 (1962).

31. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ, M. REIN:
"Steady state equilibria of some DPN-linked reactions and the oxidation/reduction state of the DPN/DPNH system."
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 159 (1961).

32. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ, M. REIN, H.J. HÜBENER:
"The oxidation/reduction state of the extramitochondrial DPN/DPNH system in rat liver and the hormonal control of substrate levels in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 163 (1961).

33. HURLBERT, R.B., H. SCHMITZ, A. BRUMM and R.V. POTTER (Madison)
"Nucleotide Metabolism. II Chromatographic Separation of Acid Soluble Nucleotides."
J. Biol. Chem. 209, 23 (1954).

34. ISSELHARD, W., W. POHL, J.W. BERGHOFF, D. SCHMERBAUCH und H.W. SCHÜLER:
"Versuche zur Verbesserung der Energiebereitstellung im künstlich stillgelegten Herzen und in der Erholung bei Reperfusion."
Verh. Dtsch. Ges. Kreislffschg. 30, 216 (1964).

35. JUNG, S.:
"Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere."
Gustav Fischer Verlag-Stuttgart 1962 S. 223.

36. KAMMERMEIER, H.:
"Verhalten von Adenin-Nukleotiden und Kreatinphosphat im Herzmuskel bei funktioneller Erholung nach länger dauernder Asphyxie."
Verh. Dtsch. Ges. Kreislffschg. 30, 206 (1964).

37. KESSLER, D.W.LÜBBERS und R. SCHOLZ: unveröffentlicht.

38. KIRSTEN, E., C. GEREZ und R. KIRSTEN:
"Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks, geeignet für Extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten."
Biochem. Z. 337, 312 (1963).

39. KLEINOW, W., R. SCHOLZ und Th. BÜCHER:
"Der Rhytmus der Glykogenspeicherung und seine Auswirkung auf den Katabolismus der perfundierten Rattenleber."
In Vorbereitung.

40. KLINGENBERG, M. und H.v. HÄFEN:
"Wege des Wasserstoffs in Mitochondrien. I. Die Wasserstoffübertragung von Succinat zu Acetoacetat."
Biochem. Z. 337, 120 (1963).

41. KOLTKOFF, I.M. and J.J. LINGANE:
"Polarography."
New York and London: Interscience Publishers 1952.

42. LAKSHMANAN, T.K., S. LIEBERMAN:
Arch. Biochem. 45, 235 (1953).

43. LARDY, H.A.:
"On the direction of pyridine nucleotide oxydation-reduction reactions in gluconeogenesis and lipogenesis."
In: Control of energy metabolism.
Ed. B. Chance. New York, London: Acad. Pr. 1965, p. 245.

44. LARDY, H.A., and PARKS, R.E., Jr., in Enzymes:
Units of Biological Structure and Function, Ed. Gaebler,o., Acad. Press, New York, 1956, p. 584.

45. LÜBBERS, D.W., M. KESSLER, R. SCHOLZ and TH. BÜCHER:
"Cytochrome Reflection Spectra and Fluorescence of the Isolated, Perfused, Hemiglobin-free Rat Liver during a Cycle of Anoxia."
Biochem. Z. 341, 346 (1965).

46. LYNEN, F.:
"Phosphatkreislauf und Pasteur-Effekt."
Vortrag, 8. Coll. Ges. Physiol. Chemie, Mosbach/Baden, Mai 1957, Berlin: Springer 1958 S. 155.

47. LYNEN, F., HARTMANN, G., NETTER, K.F., and SCHUEGRAF, A.:
in G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor (Editors):
Regulation of Cell Metabolism,
I and A. Churchill, London 1959, p. 256.

48. MANSOUR, T.E., and MANSOUR, J.M.:
J. Biol. Chem., 237, 629 (1962).

49. MEYER, E., B.v. BOCK:
"Der Pasteur-Effekt und sein Reaktionsmechanismus. Über die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorylase."
Herbsttagung Ges. Physiol. Chemie, Marburg 1966.

50. MEYERHOF, O.;
"Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe."
Biochem. Z. 162, 43 (1925).

51. MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON and W.B. BALE:
"The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-e-C^{14}."
J. expt. Med. 94, 431 (1951).

52. MUNTZ, J.A.:
Archiv Biochem. and Biophys., 42, 435 (1953).

53. PABST Laboratories, Milwaukee,5, Wiskonsin, USA:
"Ultraviolett Absorption-Spectra of 5'- Ribonucleotides."
Circular OR-10 (1956).

54. PAPENBERG, K., KLINGENBERG, M., H.W. HELDT:
"Säurespaltprodukte reduzierter Pyridinnukleotide."
11. Mosbacher Kolloquium, "Zur Bedeutung der freien Nukleotide," Heidelberg, p. 25 (1961).

55. PASSONEAU, J.V. and LOWRY, O.H.:
"Phosphofruktokinase and the Pasteur-Effect."
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 10 (1962).

56. PASSONEAU, J., and O.H. LOWRY:
"P-Fruktokinase and the control of the citric acid cycle."
Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 372 (1963).

57. PASTEUR, L.:
Etudes sur la Bierre. Paris (1876).

58. PETTE, D., H.W. HOFER:
"Fruktose-6-Phosphat-Kinase und Gklukose-1- Phosphat-Kinase, ihre regelnden Wirkungen im Kohlenhydratstoffwechsel."
Herbsttag. Ges. Physiol. Chem. Berlin 1965.

59. SCHIMASSEK, H.:
"Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic medium and control of liver function.
Life Sciences 11, 629 (1962).

60. SCHIMASSEK, H.:
"Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Leber."
Biochem.Z. 336, 460 (1963).

61. SCHIMASSEK, H., W. GEROK:
"Control of the levels of free amino-acids in plasma by the liver."
Biochem. Z. 343, 407 (1965).

62. SCHLENK, F.:
"Chemistry and Enzymology of Nucleic Acids."
Adv. Enzymology 9, 481 (1949).

63. SCHMITZ, H. und G. WALPURGA (Marburg):
"Trennung von Phosphorsäureestern durch Ionenaustausch-Chromatographie."
Angew. Chemie 71, 549 (1959).

64. SCHNITGER, H., K. PAPENBERG, E. GANSE, R. CZOK, Th. BÜCHER und H. ADAM:
"Chromatographie phosphathaltiger Metabolite eines menschlichen Leberpunktates."
Biochem. Z. 332, 167 (1959).

65. SCHNITGER, H., SCHNITGER, ST., J. GRUNST, U. PATAT, R. SCHOLZ und TH. BÜCHER: "Automatische Anionenaustauschchromatographie im nanoMol-Bereich." In Vorbereitung.

66. SCHNITGER, H., SCHOLZ, R., BÜCHER, Th., LÜBBERS, D.W.:
"Comparative fluorometric studies on rat liver in vivo and on isolated perfused hemoglobin-free liver."
Biochem. Z. 341, 334 (1965).

67. SCHOLZ, R.:
In "Leberperfusion", 3. Konf. Ges. Biol. Chem. Östrich 1967, in Vorbereitung.

68. SCHOLZ, R., BÜCHER, Th.:
"Hemoglobin-free perfusion of rat liver. Control of energy metabolism."
Ed. B. Chance. Acad. Pr. 1965, p. 393.

69. SCHOLZ, R., J. GRUNST und Th. BÜCHER:
"Wirkungen des Äthanols auf den intermediären Stoffwechsel."
In Vorbereitung.

70. SCHOLZ, R., SCHWARZ, F. und Th. BÜCHER:
"Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei durchströmten Leber der Ratte."
Z. Klin. Chemie 4, 179 (1966).

71. SCHWARZ, F.:
"Barbiturat-Wirkungen auf die hämoglobinfrei perfundierte Rattenleber."
Diss., Med. Fak. München (1967), in Vorbereitung.

72. SUTHERLAND, E.N.:
"Polysaccharid Phosphorylase, Liver."
Methods in Enzymology Vol. I. Ed. S.P. Collwick and N.O. Kaplan. Acad. Press, New York 1955 S. 215.

73. TÖDT, F.:
"Elektrochemische Sauerstoffmessung."
Berlin: Walter de Gruyter u. & 1958.

74. TROWELL, O.A.:
"Urea formation in the isolated perfused liver of the rat."
J. Physiology 100, 432 (1942).

75. UNDERWOOD, A.H. and E.A. NEWSHOLME:
"Properties of Phosphofruktokinase from Rat Liver and their Relation to the control of Glycolysis and Gluconeogenesis."
Biochem. J. 95, 868 (1965).

76. WARBURG, O. (Berlin-Dahlem):
"Chemische Konstitution von Fermenten."
Ergebn. Enzymforschung 7, 210 (1938).

77. WILLIAMSON, D.H., J. MELLANBY and H.A. KREBS:
"Enzymic determination of D(-)-ß-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood."
Biochem. Z. 82, 90 (1962).

78. ZEHNER, J.:
Diss., Med. Fak., Univ. München 1967,
in Vorbereitung.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. nat., Dr. med. h.c. Theodor Bücher danke ich nicht nur für die Unterstützung dieser Arbeit, sondern für viele Jahre reicher wissenschaftlicher und menschlicher Förderung.

Mit Dankbarkeit gedenke ich Herrn Dr. H. Schnitgers, als dessen Amanuensis ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation begonnen habe.

Besonders verpflichtet bin ich Herrn Privatdozenten Dr. R. Scholz, der mir für die Ausführung und die Auswertung der Versuche wichtige Ratschläge und für die Darstellung der Ergebnisse zahlreiche Anregungen gegeben hat.

Lebenslauf

Am 20. März 1939 wurde ich als zweiter Sohn des Hauptwachtmeisters Otto Grunst und seiner Ehefrau Margarete Grunst, geb. Nest, in Stolp/Pommern geboren. Seit 1965 bin ich mit Christiane Bockelmann verheiratet, wir haben eine Tochter.

Nach 4 Jahren Grundschule besuchte ich die Melanchthonschule im Steinatal/Krs. Ziegenhain und das Realgymnasium in Korbach, Krs. Waldeck, in dem ich am 28.2.1959 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im Sommersemester 1959 begann ich in Marburg/Lahn das Studium der Chemie. Seit Wintersemester 1960/61 studierte ich in Marburg Medizin. Ich legte hier am 27.4.61 die "Naturwissenschaftliche Vorprüfung" und am 26.10.62 die "Ärztliche Vorprüfung" ab. Seit dem ersten klinischen Semester habe ich in den Physiologisch-Chemischen Instituten Marburg und München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Th. Bücher wissenschaftlich gearbeitet. Im Arbeitskreis von Herrn Dr. H. Schnitger war ich an der Entwicklung der automatischen Anionenaustauschchromatographie für Nukleotide beteiligt und erlernte außerdem enzymatische Methoden. Am 17.2.66 bestand ich in München nach insgesamt 11 Fachsemestern die "Ärztliche Prüfung".

Von März bis Dezember 1966 arbeitete ich als Medizinalassistent im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München. Im Arbeitskreis von Herrn Dr. R. Scholz habe ich Stoffwechseluntersuchungen am Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber durchgeführt. Ein Teil dieser Untersuchungen , sowie die Beschreibung der automatischen Anionenaustauschchromatographie sind Inhalt der vorliegenden Dissertation. Meine weitere Medizinalassistentenzeit absolvierte ich in München in der Chirurgischen Universitätsklinik, in der I. Universitätsfrauenklinik. Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent in der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Schwabing.

Meine akademischen Lehrer waren

1. in Marburg

die Herren Professoren Bücher, Hensel, Niessing, Petry, Dimroth, Kessler, Seidel, Walcher, Gedigk, Huber, Linneweh, Schölmerich, Schmid, Schwaiger, Siegert, Würtele;

2. in München

die Herren Professoren Bickenbach, Bodechtel, v. Braunbehrens, Büngeler, Eyer, Fickentscher, Heiss, Hermann, Hilber, Holle, Kiese, Kolle, Lange, v. Lanz, Laves, Marchionini, Rohrschneider, Schirren, Seitz, Spann, Weber, Wiskott, Zenker.